# Peptidsynthese an Celluloseacetat

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
**Peter-Jürgen Kramer**
aus Esslingen

1977

77 282

# Peptidsynthese an Celluloseacetat

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
dem Fachbereich Chemie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von
**Peter-Jürgen Kramer**
aus Esslingen

1977

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Juni 1977

| | |
|---|---|
| Dekan: | Professor Dr. W. Zeil |
| 1. Berichterstatter | Professor Dr.Dr. G.Weitzel |
| 2. Berichterstatter | Professor Dr. U.Weber |

Diese Arbeit wurde unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. G. Weitzel am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Meinem Lehrer danke ich für die großzügige Förderung und Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas.

Herrn Dr. S. Hörnle danke ich für die Anregungen und die Ratschläge, die ich von ihm für meine Arbeit erhielt. Den Herren Prof. Dr. U. Weber, Univ.Doz. Dr.K. Eisele, W. Eichler und M. Caviezel möchte ich ebenfalls für viele wertvolle Hinweise danken.

Mein Dank gilt auch der analytischen Abteilung des Instituts unter der Leitung von Frau Dr. A.-M. Fretzdorff für die Ausführung der Aminosäure- und Elementaranalysen.

Herrn M. Schmidt (ETH Zürich) danke ich für die Unterstützung bei der Messung der biologischen Aktivität der Angiotensine.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41523712_0079

INHALTSVERZEICHNIS


| | | Seite |
|---|---|---|
| 1. Einleitung und Fragestellung | | |
| 1.1. | Aufgabe und Leistung der Peptidsynthese | 1 |
| 1.2. | Strategie der Peptidsynthese | 1 |
| 1.3. | Ziel der Arbeit | 8 |
| 1.4. | Cellulasen | 9 |
| 1.5. | Cellulose | 9 |
| 1.6. | Cellulosederivate | 10 |
| 1.6.1. | Celluloseester | 11 |
| 1.6.2. | Celluloseäther | 12 |
| 1.6.3. | Eigenschaften der Cellulosederivate | 13 |
| 1.7. | Der verwendete Träger | 15 |
| 2. Material und Methoden | | |
| 2.1. | Abkürzungen | 16 |
| 2.2. | Material | |
| 2.2.1. | Substanzen | 17 |
| 2.2.2. | Geräte | 19 |
| 2.3. | Pufferlösungen | 21 |
| 2.4. | Analytische Methoden | |
| 2.4.1. | Aminosäureanalyse | 24 |
| 2.4.2. | Elementaranalysen | |
| 2.4.3. | Spezifische Drehwerte | |
| 2.4.4. | Schmelzpunkte | |
| 2.4.5. | Dünnschichtchromatographie | |
| 2.4.6. | Elektrophoresen | |
| 2.4.6.1. | Papierelektrophorese | 26 |
| 2.4.6.2. | Elektrophorese auf CA-Folie | 26 |
| 2.4.6.3. | Analytische Disk-Elektrophorese | 27 |
| 2.4.7. | Umsatzkontrolle durch Ninhydrintest | 28 |
| 2.4.8. | Bestimmung des Acetylgehalts von C.A. | 29 |
| 2.4.9. | Bestimmung der Cellulase-Aktivität | |
| 2.4.9.1. | Bestimmung mit der DNS-Methode | 30 |
| 2.4.9.2. | Bestimmung durch Viskosimetrie | 30 |

Seite

2.4.10. Bestimmung der Esterasen-Aktivität 31
2.4.11. Bestimmung proteolytischer Aktivität 32
2.4.12. Bestimmung der biologischen Aktivität der Angiotensin II - Präparate 33
2.4.13. Proteinbestimmungen
2.4.13.1. Biuret-Proteinbestimmung 36
2.4.13.2. Proteinbestimmung nach Lowry 37
2.4.14. Bestimmung der reduzierenden Zucker 38
2.4.15. Abschätzung des Molekulargewichts
2.4.15.1. Durch Bestimmung des Verteilungskoeffizienten auf einer Sephadex G-75 - Säule 39
2.4.15.2. Durch Gelchromatographie an einer geeichten Sephadex G-150 - Säule 39
2.4.16. Bestimmung des isoelektrischen Punktes
2.4.16.1. Elektrophoresen auf C.A.-Folie 40
2.4.16.2. Elektrofokussierung 40
2.5. Darstellung und Eigenschaften der verwendeten Aminosäurenderivate 42

3. Beschreibung der Versuche

3.1. Darstellung hochacetylierter Cellulose 48
3.2. Partielle Hydrolyse hochacetyl.Cellulose 48
3.3. Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit dem Celluloseacetat
3.3.1. Aktivierung der Aminosäure mit DCC u. HOBt 49
3.3.2. Aminosäure als symmetr. Anhydrid aktiviert 49
3.4. Blockierung freier, nicht-veresterter Hydroxylgruppen
3.4.1. Für acidolytisch empfindliche AS-Derivate 50
3.4.2. Für acidolytisch unempfindliche AS-Derivate 50
3.5. Abspaltung des Peptids vom Träger
3.5.1. Alkalische Verseifung der Esterbindung 51
3.5.2. Ammonolyse 51

Seite

3.5.3. Versuche zur enzymatischen Hydrolyse des Celluloseacetat-Trägers

3.5.3.1. Enzymatische Hydrolyse des 2,5-C.A. mit kommerzieller T.v.-Cellulase 52

3.5.3.2. Enzymatische Hydrolyse von 2,5-C.A. mit einem Enzymgemisch aus T.v.-Cellulase und Citrus-Acetylesterase 52

3.5.3.3. Enzymatische Hydrolyse des 2,5-C.A. mit über Seph. G-25 entsalzten Kulturfiltraten der Anreicherungskulturen von 3.10.2.2. 53

3.6. Abspaltung der Dnp-Schutzgruppe 54

3.7. Abspaltung von AS-Schutzgruppen mit kondensiertem Fluorwasserstoff 54

3.8. Reinigung der käuflichen T.v.-Cellulase 56

3.9. Isolierung und Reinigung von Acetylesterase (EC 3.1.1.6.) aus Orangenschalen

3.9.1. Methode nach Jansen, Jang und Mc.Donnell 58

3.9.2. Neue Methode zur Isolierung und Reinigung von Acetylesterase aus Orangenschalen 59

3.9.3. Untersuchungen zur Substratspezifität der Citrus-Acetylesterase 60

3.10. Pilzkulturen zur Gewinnung von extracellulären Enzymen, die sich für den Abbau von 2,5-Celluloseacetat eignen.

3.10.1. Submerskultur von Trichoderma viride 61

3.10.2. Kultur von unbekannten celluloseverwertenden Pilzen

3.10.2.1. Anreicherungskultur durch selektive Wachstumsbedingungen 62

3.10.2.2. Submerskultur der angereicherten Pilze 62

3.11. Synthese verschiedener Peptide

3.11.1. Synthese von Boc-Ile-Val-Gly-Ala-OH 64

3.11.2. Synthese von $Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II

3.11.2.1. Synthese von des($Asp^1$, $Arg^2$)$Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II 66

Seite

3.11.2.2. Synthese von $Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II 67
3.11.3. Synthese von $Ile^5$-Angiotensin II 69

4. Ergebnisse

4.1. Peptidsynthese an Celluloseacetat
4.1.1. Acetylierung von Cellulose 73
4.1.2. Einstellen des gewünschten DS 74
4.1.3. Fixierung der C-terminalen Aminosäure 75
4.1.4. Blockierung nicht veresterter Hydroxylgruppen 76
4.1.5. Entfernung überschüssiger Reagenzien 76
4.1.6. Abspaltung des Peptids vom Träger
4.1.6.1. Verseifung der Esterbindung 77
4.1.6.2. Ammonolyse 77
4.1.6.3. Versuche zur enzymatischen Hydrolyse des Celluloseacetat-Trägers 78
4.2. Reinigung der käuflichen T.v.-Cellulase (E.C. 3.2.1.4. u. E.C. 3.2.1.21.) 79
4.3. Isolierung und Reinigung von Acetylesterase aus Orangenschalen (E.C. 3.1.1.6.)
4.3.1. Methode nach Jansen, Jang und Mc.Donnell 82
4.3.2. Neue Methode zur Isolierung und Reinigung von Acetylesterase aus Orangenschalen 87
4.4. Pilzkulturen zur Gewinnung von extracellulären Enzymen, die sich für den Abbau von 2,5-Celluloseacetat eignen
4.4.1. Submerskultur von Trichoderma virdide 90
4.4.2. Kultur von unbekannten celluloseverwertenden Pilzen 90
4.4.2.1. Anreicherungskultur durch selektive Wachstumsbedingungen 90
4.4.2.2. Submerskultur der angereicherten Pilze 91
4.5. Synthesen verschiedener Peptide
4.5.1. Synthese des Modellpeptids Boc-Ile-Val-Gly-Ala-OH 92

Seite

4.5.2. Synthese von $Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II

4.5.2.1. Synthese von des($Asp^1$,$Arg^2$)$Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II 93

4.5.2.2. Synthese von $Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II 98

4.5.3. Synthese von $Ile^5$-Angiotensin II 102

5. Diskussion 108

6. Zusammenfassung 112

7. Literaturverzeichnis 114

Lebenslauf 121

# 1. Einleitung und Fragestellung

## 1.1. Aufgabe und Leistung der Peptidsynthese

a. Die Bestätigung der durch Sequenzanalysen ermittelten Strukturen. Du Vigneaud (1) konnte bereits 1954 durch die erste Synthese des Hypophysenhormons Oxytocin den entscheidenden Beweis für die Richtigkeit der Sequenzanalysen antreten. Seither wurden viele höhere Peptide mit voller biologischer Aktivität synthetisiert.

b. Die Aufklärung der Beziehung zwischen Konstitution und biologischer Aktivität von biologisch aktiven Peptiden und Proteinen. Das Ziel ist molekulare Mechanismen zu ergründen, die am Wirkungsort dieser Substanzen ablaufen.

c. Die Änderung der Wirksamkeit oder der Spezifität durch Variation der natürlichen Sequenzen. Diese pharmakologisch interessante Arbeitsrichtung hat z.B. Boissonnas (2) zur Synthese modifizierter Oxytocine, Vasopressine und Kinine sowie Weitzel und Mitarbeiter (3-7) zur Synthese modifizierter Insuline angeregt.

d. Die Möglichkeit der wirtschaftlichen Herstellung von pharmazeutisch interessanten Peptiden. Oxytocin, Vasopressin, Angiotensin und ein aktives Fragment von ACTH sind die wichtigsten Beispiele. Die Releasing-Hormone TRH und LRH werden in steigendem Maße für diagnostische Zwecke benützt und können, zusammen mit anderen verwandten Peptiden, in der Zukunft wichtige therapeutische Bedeutung erlangen.

## 1.2. Strategie der Peptidsynthese

Die Klassifizierung der Strategien kann nach unterschiedlichen Gesichtspunkten vorgenommen werden. Alternativen wären z.B.:

a. Synthese in homogener Phase (klassische Peptidsynthese)
   Synthese in heterogener Phase (z.B. Festkörpersynthese nach Merrifield)

b. Maximaler Schutz der funktionellen Gruppen in den Seitenketten
   Minimaler Schutz der funktionellen Gruppen in den Seitenketten

c. Methoden, die die Isolierung von Zwischenprodukten beinhalten
   Methoden, die die Nichtisolierung von Zwischenprodukten beinhalten

d. Aufbau der Peptidkette durch Fragmentkondensation
   Stufenweiser Aufbau der Peptidkette

Diese Klassifizierungen sind selbstverständlich willkürlich. Normalerweise werden für eine Synthese verschiedene Strategien kombiniert.

Die klassische oder konventionelle Peptidsynthese verläuft in homogener Phase, d.h. wie bei den meisten chemischen Synthesen sind die Reaktionspartner im Reaktionsmedium gelöst. Die Reaktionsgeschwindigkeit hängt von der Wahrscheinlichkeit des Zusammenstosses der Reaktionspartner ab. Die Reaktionsgeschwindigkeit ist somit relativ groß. Es genügt ein Überschuß von 10 bis 20%, um 80% Ausbeute und mehr zu erhalten.

Die klassische Peptidsynthese unter Verwendung der maximalen Schutzgruppentechnik versucht die Bildung von Nebenprodukten völlig auszuschalten. Das Syntheseprodukt kann auf jeder Stufe isoliert und charakterisiert werden. Sie liefert deshalb die einheitlichsten Produkte. Fast alle Synthesen von Peptid-Wirkstoffen, die erstmals ein mit dem Naturstoff identisches Material lieferten, wurden auf diese Weise hergestellt. Da mit wachsender Kettenlänge die Löslichkeit der Peptide in organischen Lösungsmitteln abnimmt und somit heterogene Reaktionen den weiteren Aufbau

behindern, sind dieser Methode Grenzen gesetzt. Durch den Einsatz von mehr hydrophoben Schutzgruppen für die funktionellen Seitenketten müßte allerding auch mit dieser Methode der Aufbau größerer Moleküle möglich werden. Der entscheidende Nachteil dieser Methode ist ihre aufwendige, schwierige und zeitraubende Arbeitsweise.

| Strategie | Vorteile | Nachteile |
|---|---|---|
| klassische Peptidsynthese | kontrolliertes Arbeiten | zeitraubende Arbeitsweise |
| | razemisierungsfreie Kupplung möglich | relat. geringe Gesamtausbeute |
| | einheitliches Endprodukt | keine Mechanisierung mögl. |

Tab.1

Die revolutionäre Technik der Festkörpersynthese wurde von Merrifield (8) eingeführt. Sie ist charakterisiert durch die stufenweise Addition von löslichen N-geschützten Aminosäuren an die Aminokomponente, die mit ihrer Carboxylfunktion an einen unlöslichen polymeren Träger gebunden ist. Da hierbei die Gesamtsequenz ohne die zeitraubenden Reinigungsschritte der klassischen Synthese synthetisiert wird, ist der 100% ige Verlauf der Kupplungen sowie der Abspaltungen der N-terminalen Schutzgruppen eine Voraussetzung für das Erhalten eines einheitlichen Endproduktes. Trotz der großen Überschüsse, die bei dieser Methode verwendet werden, beträgt die mittlere Ausbeute eines Kupplungsschrittes etwa 96% bis 99% . Ermittelt man mit diesen Zahlen die Ausbeute über alle Stufen, so ergibt sich, daß Peptide mit ca. 10 Aminosäuren sehr gut hergestellt werden können. Dies beweisen die vielen Synthesen von Oxytocin-, Vasopressin-, Angiotensin- und Bradykinin-Analoga (9 - 11). Für die Insulinketten oder das ACTH sind

dagegen bereits kaum realisierbare Kupplungsausbeuten von ca. 99% erforderlich. Sequenzen mit über 100 Aminosäuren werden selbst bei Ausbeuten von 99,5% in weniger als 50% Gesamtausbeute erhalten.
Diese Gesamtausbeuten sind aber auch bei einer relativ niedrigen Ausbeute des Einzelschrittes immer noch höher als bei einer Synthese der gleichen Sequenz nach der Strategie der klassischen Methode mit Isolierung und Reinigung der Zwischenprodukte.
Bei der Festkörpersynthese kann diese Reinigung erst am Endprodukt erfolgen. Bei einer Synthese der Insulin-B-Kette mit einer Einzelschrittausbeute von 97% müssen z.B. die als Gesamtausbeute erhaltenen 40% von den 60% Fehlsequenzen abgetrennt werden. Die sehr große Ähnlichkeit dieser verkürzten Sequenzen mit dem Endprodukt, macht eine Abtrennung nahezu unmöglich. Nur bei größeren Unterschieden kann mit einer erfolgreichen Abtrennung gerechnet werden. Die Fehlsequenzen erschweren den Identitätsbeweis eines Synthese produktes. Eine korrekte Aminosäureanalyse stellt z.B. für sich allein nur ein schwaches Kriterium für die Homogenität eines Produktes dar. Nebenprodukte können korrekte Analysen ( 12) geben. Die Fehlergrenzen sind zu groß, um die Anwesenheit von weniger als 5% Fehlsequenzen zu entdecken.
Auch bei der Bestimmung der biologischen Aktivität wirksamer Analoga von biologisch aktiven Peptiden können die Fehlsequenzen stören. Liegen die Aktivitäten solcher Analoga unter 5-10% so wird die Festkörpermethode sogar unbrauchbar. Eine Aktivität von z.B. 1% könnte bedeuten, daß das Syntheseprodukt 1% eines Fehlsequenzenpeptides mit voller Aktivität oder 10% eines Fehlsequenzenpeptides mit 10% Aktivität enthält.
Für eine große Zahl von Analoga stellt die Festkörpersynthese natürlich die ideale Methode dar, da nur durch sie die bequeme und schnelle Synthese von vielen Peptiden möglich ist.

| Strategie | Nachteile |
|---|---|
| Festkörpersynthese nach Merrifield | Unvollständige Kupplungen und Schutzgruppenabspaltungen führen zur Anhäufung verkürzter Peptide (13,14). |
| | Nichtspezifische Abspaltung von Seitenketten-Schutzgruppen kann zu Verzweigungen führen (15). |
| | Auf Grund von Razemisierung werden verschiedene Konfigurationen mit korrekten Sequenzen erhalten. (16-18) |
| Vorteile | Diacylamin-Bildung (19, 20) möglicherweise gefolgt von Kettenverkürzung (21) oder Kettenverlängerung (22) kann wegen dem Gebrauch eines hohen Überschusses von aktivierten N-geschützten AS-Derivaten bei jedem Kupplungsschritt auftreten. |
| Einfache Durchführung | Großer Aufwand für N-gesch. AS durch Verbrauch großer Mengen. |
| Schnelligkeit der Synthese | Die verfügbaren analyt.Kontrollen sind nicht empfindlich genug den Reaktionsprozess im Bereich von 99,5-99,9% zu überwachen. |
| Möglichkeit der Automatisierung bzw. Mechanisierung | Zersetzung oder Modifikation bestimmter AS kann auf die drastischen Bedingungen, bei der Abspaltung des fertigen Peptids, zurückgeführt werden. |

Tab. 2

Da die Festkörpersynthese gegenüber der klassischen Synthese den großen Vorteil der Schnelligkeit aufweist, haben es sich viele Arbeitsgruppen zur Aufgabe gemacht, diese Methode insoweit zu modifizieren, daß die hauptsächlichen Störfaktoren beseitigt sind.

Die Kontrolle des Syntheseverlaufs hat hierbei eine wichtige

Rolle gespielt. Es wurden Methoden entwickelt, die mit Hilfe titrimetrischer (23), kolorimetrischer (24) und fluorimetrischer (25) Messungen sowie dem Gebrauch von radioaktiven Isotopen (26) eine kontinuierliche, einfache, schnelle und empfindliche Überwachung der Kupplungsschritte ermöglichen sollte. Leider waren all diesen Bemühungen bisher nur Teilerfolge beschieden.

Die Verhinderung von Fehlsequenzen wurde auf verschiedenen Wegen versucht:
Merrifield versuchte ( 8 ) durch den Einsatz eines stark acylierenden Mittels (terminating agent) nicht reagierte α-Aminogruppen zu maskieren und so ein Wachsen von Fehlsequenzen zu verhindern. Diese Idee wurde auch in der Folgezeit aufgegriffen ( 13, 27 ) aber es ist immer noch nicht völlig gesichert, ob die nicht reagierenden Aminogruppen mit dem Terminationsmittel quantitativ reagieren.

Intensive Forschungen wurden der Frage gewidmet, wodurch diese Fehlsequenzen überhaupt entstehen. Es ist ziemlich klar, daß sie in direktem Zusammenhang mit den Änderungen der physikalischen Eigenschaften des festen Trägers während der Synthese stehen. Quellung und Solvatation des polymeren Trägers verändern sich im Verlauf der Synthese auf Grund des wachsenden Beitrags des Peptids zu den gemeinsamen physikalischen Eigenschaften der Peptid-Polymer-Verbindung. Weitere Effekte mögen von den häufigen Lösungsmittelwechseln während der Synthese herrühren. Peptidketten, die an verschiedenen Stellen des Polymers gelegen sind, können so exponiert oder versteckt und somit verschieden zugänglich für die mit ihnen reagierenden Reagenzien sein.
Der Gebrauch von starren makroporösen Polymeren (28) und makroretikularen Polymeren mit wenig Quervernetzung ( 29 ) sollte diese Effekte vermeiden.

Die Verminderung von Diffusionseffekten konnte durch die Verwendung von Trägern erreicht werden, bei denen die Peptide während der Synthese an der Oberfläche von Kugeln wachsen. Als Material für diese Kugeln ist Glas (30) und Teflon (31) verwandt worden.

Um die Vorteile der klassischen und der Festkörpermethode zu kombinieren, vor allem um unvollständige Reaktionen zu vermeiden, benützte Shemyakin (32) chlormethyliertes Emulsions-Polystyrol als löslichen polymeren Träger. Der allgemeine Syntheseplan blieb bei diesem Verfahren bestehen. Nach dem Kupplungsschritt wurde das Polymer-Peptid durch Zugabe von Wasser ausgefällt und auf der Nutsche gewaschen.
Bayer und Mitarbeiter (33) haben mit vielversprechenden Arbeiten diese Idee in neuerer Zeit wieder aufgegriffen. Sie benützen als lösliche Träger: Polyäthylenglykol, Polyvinylalkohol oder Polyvinylamin mit Polyvinylpyrrolidon copolymerisiert. Nach den bisher veröffentlichten Arbeiten scheinen die nach dieser Methode in homogener Phase durchgeführten Synthesen sehr effizient und von geringem Zeitbedarf zu sein. Ein Nachteil dieser Methode ist die Art und Weise der Abspaltung des fertigen Peptids. Die zur Spaltung der Esterbindung notwendige alkalische Hydrolyse ist wegen der Razemisierungsgefahr problematisch.

Eine andere Art der Peptidsynthese unter Zuhilfenahme von Polymerträgern ist die Polymerreagenz-Synthese (sog. Anti-Merrifield-Methode) (34, 35). Die nach dem Schema $\text{Polymer-A}_n + B \longrightarrow \text{Polymer-A}_{n-1} + AB$ verlaufende Synthese brachte einige Vorteile, wie allerdings erst bei relativ kleinen Peptiden (36) gezeigt werden konnte. Bei längeren und komplizierteren Peptiden werden die Vorteile durch die schlechtere Löslichkeit dieser Peptide und die größere sterische Behinderung wieder zunichte gemacht.

## 1.3. Ziel der Arbeit

Wie aus der Diskussion der verschiedenen Synthesestrategien zu ersehen ist, gibt es bis jetzt keine universell anwendbare und den anderen in jedem Fall überlegene Synthesemethode.
Die Peptidsynthese am unlöslichen polymeren Träger hat gegenüber der konventionellen Peptidsynthese den großen Vorzug der Einfachheit, der Schnelligkeit und der guten Ausbeuten.
In dieser Arbeit sollte der Versuch unternommen werden, einen Träger zu benutzen, der die Aussicht bietet, enzymatisch abbaubar zu sein. Auf diese Weise könnte der Träger spezifisch und ohne Schädigung des Peptides entfernt werden. Dieser Träger sollte natürlich auch eine möglichst einfach und unproblematisch verlaufende Peptidsynthese ermöglichen.
Der in Frage kommende Träger sollte bei der Synthese eines biologisch aktiven Peptides seine Tauglichkeit beweisen.

## 1.4. Cellulasen

Cellulasen sind eine Gruppe von Enzymen, die sowohl native als auch derivatisierte Cellulose abbauen können (37, 82). Für einen Träger auf Cellulosebasis besteht also unter Umständen die Möglichkeit mittels einer Cellulase den Träger nach beendeter Peptidsynthese zu zerstören, um auf diese Weise das fertige Peptid vom Träger zu trennen. Die Suche nach einem synthesetauglichen Träger beschränkte sich deshalb in dieser Arbeit auf verschiedene Derivate der Cellulose.

## 1.5. Cellulose

Cellulose besteht aus Ketten von ß-D-Glucoseeinheiten, die durch 1,4-glykosidische Bindungen verknüpft sind. Celluloseketten sind unverzweigt. Die glykosidischen Bindungen zwischen den Glucoseeinheiten sind alkalistabil aber durch Säure vollständig hydrolysierbar.

Jede Anhydroglucose-Einheit besitzt 3 Hydroxylgruppen: eine primäre und zwei sekundäre. Aus IR-Spektren ( 38 ) weiß man, daß alle Hydroxylgruppen in fester Cellulose an der Bildung von H-Brücken-Bindungen mit benachbarten Sauerstoffatomen teilnehmen. Um die Cellulose zu lösen oder Derivate zu bilden, ist es notwendig diese Bindungen zu lösen.

Die drei Hydroxylgruppen jeder Glucoseeinheit haben untereinander verschiedene Eigenschaften. In der Reihenfolge 2→3→6 besitzen sie abnehmende saure Eigenschaften. Dies führt z.B. bei der Ätherbildung zu einer leichten Bevorzugung der 6-Hydroxylgruppe.

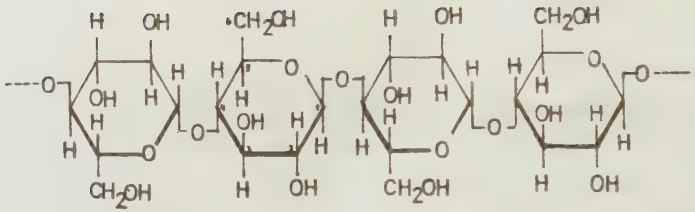

Abb.1 Ausschnitt eines Cellulosemolküls

Bei der Veresterung aliphatischer Alkohole werden im allg. primäre gegenüber sekundären Hydroxylgruppen bevorzugt. Die Unterschiede sind nicht sehr groß. Primäre Hydroxylgruppen sind im allgemeinen 1,5 bis 3,5 mal reaktiver als die sekundären. Die relativen Reaktivitäten der Cellulose-Hydroxylgruppen bei der Acetylierung wurden von mehreren Arbeitsgruppen untersucht(39-43). Bei einem Celluloseacetat mit Substitutionsgrad (DS) um 2,5 sind die nicht veresterten Hydroxylgruppen zu ca. 40% primäre Hydroxylgruppen. Dies bedeutet jedoch kein Maß für die relative Veresterungs-Reaktivität sondern, da dieses Produkt durch Partialhydrolyse aus dem Triacetat hergestellt wurde, eine erhöhte Hydrolyserate für die Ester der primären Hydroxylgruppen. Berechnungen haben ergeben, daß die Reaktivität der 6-Hydroxylgruppen der Cellulose bei Veresterung und Ätherbildung ca. 2,5 mal höher ist als die der sekundären Hydroxylgruppen.

## 1.6. Cellulosederivate

Cellulosederivate werden durch Reaktionen der Hydroxylgruppen gebildet. Man kann sie in 3 Hauptklassen unterteilen: Addition, Substitution und Oxidation.
Die Substitutionsprodukte sind die, welche für einen Träger in Frage kommen. Sie sind auch die, welche man allgemein

als "Cellulosederivate" bezeichnet. Diese Substitutionsderivate werden in Celluloseester und Celluloseäther unterteilt. Gemischte Äther-Ester-Derivate können ebenfalls hergestellt werden.

1.6.1. Celluloseester

Veresterungen der Cellulose werden im allg. im stark sauren Medium durchgeführt. Die häufigsten Veresterungen sind: Nitrierung, Acetylierung und Sulfatesterbildung.

Bei fast allen Veresterungen der Cellulose erfolgt die eigentliche Reaktion nicht mit der Cellulose sondern mit einem Additionsprodukt aus Cellulose und Hydronium-Ionen. Die Nitrierung kann z.B. in folgender Weise formuliert werden: (44 )

$$NO_2^+ + \text{Cell-O}\underset{H}{\overset{+}{H}}\underset{H}{OH}\underset{H}{}\text{O-Cell} \longrightarrow \text{Cell-ONO}_2 + H_3O^+ + \overset{+}{H_2}\text{O-Cell}$$

Durch diesen Aufschluß der starren Cellulosestruktur können homogene Produkte erhalten werden. Wegen der Anwesenheit von Acetanhydrid in der Reaktionsmischung sind dagegen im Fall der Acetylierung keine Hydroniumionen vorhanden, die die Micellenstruktur öffnen und ein Additionsprodukt bilden könnten. Deshalb verläuft die Acetylierung sehr heterogen. Um bei Produkten mit DS<3,0 eine gleichmäßige Verteilung der Substituenten zu erhalten, wird deshalb zunächst vollständig acetyliert und danach durch kontrollierte partielle Verseifung des Triacetats der gewünschte Substitutionsgrad erhalten.

Der Substitutionsgrad (DS) ist definiert als der durchschnittliche Substitutionsgrad des Derivats und kann Werte von 0,0 bis 3,0 annehmen. DS = 3,0 entspricht der Substitution aller 3 Hydroxylgruppen jeder Glucoseeinheit.

Die Bildung von Celluloseacetaten unterscheidet sich von der Bildung anderer Cellulosederivate dadurch, daß die Faserstruktur der Cellulose dabei verloren geht. Bei allmählich fortschreitender Acetylierung löst sich das Derivat deshalb in der Reaktionsmischung und kann nur durch eine nachfolgende Fällung isoliert werden ( 45 ).

Die Acetylierung wird in einem Gemisch aus Eisessig, Acetanhydrid und einem sauren Katalysator, gewöhnlich Schwefelsäure, durchgeführt. Die letztere wird in relativ kleinen Mengen zugegeben (ca. 1% bezogen auf Cellulose). Das Acetanhydrid dient auch als Entwässerungsmittel. Der Eisessig ist lediglich Verdünnungs- und Lösungsmittel und kann auch durch Methylenchlorid ersetzt werden (44 ).

### 1.6.2. Celluloseäther

Die Ätherbildung wird im alkalischen Medium mit Alkylhalogeniden oder seltener mit Sulfaten durchgeführt. Es handelt sich normalerweise um eine bimolekulare nukleophile Substitution:

$$RO^- + R'Cl \longrightarrow \overline{ROR'Cl} \longrightarrow ROR' + Cl^-$$

Das Cellulosehydroxyl reagiert also in seiner Alkoholatform. Deshalb bestimmt die Azidität der Hydroxylgruppen, relativ zu Wasser, ihre Verätherungsreaktivität. Da die Azidität von Wasser und den Hydroxylgruppen nahezu gleich ist, haben Ätherbildung und Hydrolyse fast die gleiche Chance. Im Prinzip sollte deshalb so wenig Alkali wie möglich benutzt werden. Die untere Grenze ist durch die Menge festgelegt, die benötigt wird, um die Alkalicellulose zu bilden.

| Typ | Reagenz | Substituent |
|---|---|---|
| Ester | | |
| Nitrat | $HNO_3$ | $R\text{-}ONO_2$ |
| Sulfat | $H_2SO_4$ | $R\text{-}OSO_3H$ |
| Acetat | $(CH_3CO)_2O$ | $R\text{-}OCOCH_3$ |
| Propionat | $(C_2H_5CO)_2O$ | $R\text{-}OCOC_2H_5$ |
| Toluolsulfonat | $CH_3C_6H_4SO_2Cl$ | $R\text{-}OSO_2C_6H_4CH_3$ |
| Äther | | |
| Methyl | $CH_3Cl$, $(CH_3)_2SO_4$ | $R\text{-}OCH_3$ |
| Äthyl | $C_2H_5Cl$ | $R\text{-}OC_2H_5$ |
| Propyl | $C_3H_7Br$ | $R\text{-}OC_3H_7$ |
| Amyl | $C_5H_{11}Br$ | $R\text{-}OC_5H_{11}$ |
| Hydroxyäthyl | $C_2H_4O$, $ClCH_2CH_2OH$ | $R\text{-}OCH_2CH_2OH$ |
| Carboxymethyl | $ClCH_2COOH + NaOH$ | $R\text{-}OCH_2COONa$ |
| Benzyl | $C_6H_5CH_2Cl$ | $R\text{-}OCH_2C_6H_5$ |

Tab.3 Wichtige Substitutionsderivate der Cellulose

### 1.6.3. Eigenschaften der Cellulosederivate

Cellulosederivate finden die verschiedensten Anwendungen. Die regenerierte Cellulose und die organisch-löslichen Derivate werden vor allem für Textilfasern, Filme und Folien verwendet. Die organisch-löslichen werden auch für Lacke und Plastik benutzt. Die wasserlöslichen Derivate werden für Appreturen in der Papier- und Textilindustrie, Verdickungsmittel von Malfarben und Nahrungsmitteln und als Detergenz-Additive verwendet.

Die Eigenschaften, die die Cellulosederivate für so verschiedene Zwecke verwendbar machen, hängen von der eigentlichen Cellulosekette und von den Substituenten ab.

Die Ketten der Cellulosederivate sind im Gegensatz zu z.B. Vinyl-Polymeren (Polystyrol) viel starrer ( 44 ), d.h. Spiralisierung und Faltung treten erst bei sehr viel höheren Polymerisationsgraden (DP) auf. Bei nachlassender Solvatation, z.B. Präzipitation, besteht eine starke Tendenz zur Kristallisation. Diese Kristallgitter besitzen einen Ordnungsgrad, der umso höher ist je größer der Substitutionsgrad ist.

Die Löslichkeitseigenschaften hängen primär vom Einfluß der Substituenten, ihrer Natur, Verteilung und Menge ab, während die Kettenlänge nur eine untergeordnete Rolle spielt ( 44 ).
Cellulosederivate mit kleinem DS sind meist wasserlöslich. Hier dominiert die hydrophile Natur der Cellulosehydroxyle. Die Substituenten dienen nur dazu, die Hydroxylgruppen für das Wasser zugänglich zu machen und zwar selbst dann, wenn es sich um hydrophobe Substituenten handelt. Steigt der DS weiter an, beginnt die Natur der Substituenten zu dominieren. Im Falle von hydrophoben Substituenten steigt die Affinität zu organischen Lösungsmitteln, zuerst vom polaren und dann immer mehr vom nicht-polaren Typ. Bei sehr hohem DS ist das Derivat dann nur noch in nicht-polaren Lösungsmitteln löslich.

Bei der Benützung eines Cellulosederivates als Träger für die Peptidsynthese lassen sich also die Eigenschaften diese Derivates genau auf die Erfordernisse einstellen.

## 1.7. Der verwendete Träger

In der vorliegenden Arbeit wurde nach ausgedehnten Löslichkeitsversuchen ein Celluloseacetat (DS = 2,5) als Träger zur Peptidsynthese gewählt.

Dieses Derivat bietet:

1. Gute Löslichkeit in den in der Peptidchemie gebräuchlichen Lösungsmitteln. (Peptidsynthese in homogener Phase möglich)
2. Problemlose Präzipitation durch starke Neigung zur Kristallisation. (Keine Einschlüsse von Reagenzien)
3. Wenig empfindlich gegen mechanische Belastungen.
4. Einfache Herstellung bzw. preiswert im Handel erhältlich.
5. Möglichkeit der Einstellung jedes beliebigen DS.
6. Unproblematische Maskierung nicht veresterter Hydroxylgruppen.
7. Einfache Handhabung durch Verlust der Faserstruktur.
8. Beladung mit Peptid ist variabel.
9. Einfache Abtrennung des Peptids vom Träger.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Abkürzungen

Die Abkürzungen und Symbole der Aminosäuren und ihrer Derivate richten sich nach den von der IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature 1971 herausgegebenen Empfehlungen (46).
Darüber hinaus wurden folgende Abkürzungen benutzt:

| | |
|---|---|
| AcOH | = Essigsäure |
| AE | = Acetylesterase |
| A.niger | = Aspergillus niger |
| AS | = Aminosäure |
| Bis | = Bis(N,N'- Methylen-bis-acrylamid) |
| C | = Cellulose |
| C.A. | = Celluloseacetat |
| 2,5-C.A. | = Celluloseacetat mit DS = 2,5 |
| CMC | = Carboxymethylcellulose |
| DC | = Dünnschichtchromatographie |
| DCC | = Dicyclohexylcarbodiimid |
| DC-Harnst. | = Dicyclohexylharnstoff |
| DNS | = 3,5-Dinitrosalicylsäure |
| DP | = Polymerisationsgrad |
| DS | = Substitutionsgrad |
| E | = Extinktion |
| EE | = Essigsäureäthylester |
| EtOH | = Äthanol |
| HOBt | = 1-Hydroxybenzotriazol |
| IP | = isoelektrischer Punkt |
| i.v. | = intravenös |
| i.V. | = im Vakuum (ca. 13 Torr) |
| MeOH | = Methanol |
| MG | = Molekulargewicht |
| PÄ | = Petroläther |
| RSA | = Rinder-Serumalbumin |

| | |
|---|---|
| R.T. | = Raumtemperatur |
| TCA | = Trichloressigsäure |
| TEMED | = N,N,N',N'- Tetramethyläthylendiamin |
| THF | = Tetrahydrofuran |
| Tris | = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan |
| T.v. | = Trichoderma viride |
| U | = Unit (Einheit) |

## 2.2. Material

### 2.2.1. Substanzen

| | |
|---|---|
| L-Aminosäuren | E.Merck, Darmstadt |
| | Ajinomoto Co., Tokio |
| | Serva, Heidelberg |
| Acrylamid reinst | Serva, Heidelberg |
| Albumin aus Rinderserum | Serva, Heidelberg |
| Ammoniumpersulfat | Bio-Rad Laboratories, Mün. |
| Ammoniumsulfat f.bioch.Zwecke | Merck, Darmstadt |
| $Val^5$-Angiotensin II | ETH-Z, Inst.f.Biophysik |
| Anisol reinst | Merck, Darmstadt |
| Bromphenolblau | Merck, Darmstadt |
| t-Butyloxycarbonylhydrazid z.S. | Merck, Darmstadt |
| C.A.-Elektrophoresefolien | |
| (CA 250/0, 30 x 320 mm) | Schleicher + Schüll, Dassel |
| Carboxymethylcellulose Na-Salz | Serva, Heidelberg |
| Cellulase (T.v.) | Aldrich-Europe |
| Cellulose MN 300 | Machery + Nagel Co, Düren |
| Celluloseacetat 9985h u. 9986h | Koch-Light-Laboratories LTD |
| Cellulosetriacetat purum | Fluka AG, Buchs/Schweiz |
| CM-Cellulose Servacel CM 52 | Serva, Heidelberg |
| Coomassie Brillant Blue R-250 | Bio-Rad Laboratories, Mün. |
| DCC | Merck, Darmstadt |
| Destiller's solubles | Sitos-Werk, Minden/Westf. |

| | |
|---|---|
| Dextranblau 2000 | Pharmacia, Uppsala/Schwed. |
| Dialyseschlauch Visking 20/32 | Serva, Heidelberg |
| Dibenzylen | ETH-Z, Inst.f.Biophysik |
| Difco-Agar | Difco Laboratories, Detroit |
| 2,4-Dinitrofluorbenzol puriss p.a. | Fluka AG, Buchs/Schweiz |
| Dowex 1x2 200-400 mesh | Serva, Heidelberg |
| Dowex 50 Wx8 200-400 mesh | Serva, Heidelberg |
| Dünnschicht-Aluminium-Platten (Si, SiF und CF) | Riedel De Haen, Seelze-Hann. |
| Elektrophoresepapier Nr.2043 | Schleicher + Schüll, Berlin |
| Fluorwasserstoff | Baker Chemikalien, Groß-Ger. |
| Fuchsin krist. | Merck, Darmstadt |
| Glycerintriacetat f.bioch.Zwecke | Merck, Darmstadt |
| Hide-Powder-Azure B | Calbiochem, LosAngeles, Cal. |
| Hollow-Fiber-Dialysepatrone (Bio-Fiber 50 Miniplant) | Med.Univ.Klinik Tübingen |
| Leberesterase | Serva, Heidelberg |
| Malt Extract | Difco Laboratories, Detroit |
| Mercaptoäthanol z.Synthese | Merck, Darmstadt |
| Methylcellulose Methocel (65 HG und 90 HG, pract.) | Fluka AG, Buchs/Schweiz |
| -Naphtylacetat p.a. | Serva, Heidelberg |
| Ninhydrin p.a. | Merck, Darmstadt |
| Pepton | Difco Laboratories, Detroit |
| Riboflavin pharm. | Serva, Heidelberg |
| Saccharose reinst. | Merck, Darmstadt |
| Sephadex G-10, G-25 fine u. G-75 superfine DEAE A-25 und SP C-25 | Pharmacia, Uppsala/Schwed. |
| Tris(hydroxymethyl)-aminomethan | Merck, Darmstadt |
| Trichloressigsäure | Merck, Darmstadt |
| Urethan | ETH-Z, Inst.f.Biophysik |
| Vasopressin | Sandoz AG, Basel/Schweiz |
| Yeast Extract | Difco Laboratories, Detroit |

Octaacetylcellobiose und Pentaacetylglucose wurden nach (47, 48) hergestellt. Alle anderen hier nicht aufgeführten festen Substanzen wurden in analysenreiner Form verwendet. Die Lösungsmittel Diäthyläther, Pyridin, Tetrahydrofuran, Dioxan, Äthanol, Methanol und Methylenchlorid wurden nach den üblichen Methoden (78, 80) absolutiert. Alle anderen verwendeten Lösungsmittel wurden so eingesetzt, wie sie von den jeweiligen Firmen geliefert wurden.

Ein Stamm von Trichoderma viride wurde freundlicherweise von Herrn U.Jellinghaus Mikrobiol.Inst.Univ.Heidelberg zur Verfügung gestellt.

Versuchstiere: Ratte IVANOVAS Kisslegg , Sprayne Dawly/ SIV 50 ca.290g

2.2.2. Geräte

| | |
|---|---|
| Aminosäureanalysator: | |
| Unichrom Amino Acid Analyzer | Beckman Instruments GmbH München |
| Blutdruckregistrierung: | |
| Two channel high speed recorder MX 2 12; Mx2P Pre-amplifier cabenet with two 3461 D.C. Medium gain Pre-amplifier (without High gain 3542) Instantaneous Ratemeter Type 4522 | Devices Cimeted Instrument Division, Medicenco AG Esslingen/Schweiz |
| Dosiergerät: Lumix 6 M F | Vestale GmbH, Ammerbuch |
| Elektrophorese: | |
| Netzgerät 500 V 0,2 A - | Bachhofer |
| Elektrophorese-Apparatur | Eigenbau nach Shandon Sci. |
| Disk-Elektrophorese, Flachgelapparatur | Eigenbau nach Desaga 146200 |
| Elementaranalysen: | |
| C,H,N-Analysator Modell 240 | Perkin Elmer, Überlingen |

| | |
|---|---|
| Fraktionssammler mit Durchfluß-photometer: Radi Rac Type 3401 B mit Uvicord Type 4701 A | LKB Producter AB, Stockholm/Schweden |
| pH-Meter und pH-Stat: | |
| pH-Meter PHM 28c | Radiometer, Kopenhagen |
| Autobürette ABU 12 | |
| Titrator TTT 11b | |
| Polarimeter: Lichtelektrisches Präzisionspolarimeter LEP A2 | Zeiss, Oberkochen |
| Rotationsverdampfer: Rotvapor R | Büchi, Schweiz |
| Schüttelmaschine: Typ RC 106 | Infors AG, Basel/Schweiz |
| Spektralphotometer: PMQ II | Zeiss, Oberkochen |
| Thermostate: | |
| Durchlauf-Thermostat K-3365 | Colora Meßtechnik GmbH, Lo. |
| Eintauch -Thermostat | B. Braun, Melsungen |
| Kryostat (Ultra) | Colora Meßtechnik GmbH, Lo. |
| Viskosimeter: | |
| Ubbelohde KPG K = 0,01050 | |
| Mikrowaage B 5 | E. Mettler, Zürich |
| Schmelzpunktapparatur: | |
| nach Dr. Tottoli | Büchi, Schweiz |
| Zentrifugen: | |
| Stockzentrifuge | W. Stock, Maschinenbau KG |
| Mistral 6 L | MSE, England |
| high speed 18 | MSE, England |

## 2.3. Pufferlösungen

Puffer Nr.1 : Na-Acetatpuffer (0,1 M) pH 5,0

120,1 g Eisessig werden mit dest. Wasser auf ca. 1,8 l aufgefüllt, mit Natriumhydroxyd bis auf pH 4,95 gebracht und mit 4 N Natriumhydroxydlösung auf pH 5,0 eingestellt. Die Lösung wird dann auf 2 l aufgefüllt.

Puffer Nr.2 : Phosphatpuffer (0,01 M) pH 6,3
(0,01 M Phosphat, 0,1 M NaCl, 0,0025 M $NaN_3$)

Stammlösung: 27,22 g $KH_2PO_4$ werden zusammen mit 116,88 g Kochsalz und 3,25 g Natriumazid in ca. 1 l dest. Wasser gelöst. 2 ml konz. Natronlauge werden schnell zugegeben, um da Entweichen von $HN_3$ zu verhindern. Die Lösung wird auf 2 l aufgefüllt.
Bei Bedarf werden 100 ml der Lösung mit dest. Wasser auf 950 ml aufgefüllt, der pH mit 2 N Natronlauge auf 6,3 eingestellt und die Lösung auf 1 l aufgefüllt.

Puffer Nr.3 : Succinatpuffer (0,01 M) pH 5,0
(0,01 M $Na^+$, 0,005 M $NaN_3$)

2,7 g $Na_2$-Succinat und 0,65 g Natriumazid werden in 500 ml dest. Wasser gelöst. Dann wird feste Bernsteinsäure zugegeben bis pH 5,0 erreicht ist und die Lösung dann auf 2 l aufgefüllt.

Puffer Nr.4 : Succinatpuffer pH 7,0

Hierzu wird Puffer Nr. 3 mit 2 N Natronlauge auf pH 7,0 eingestellt.

Puffer Nr.5 : TRIS-Puffer pH 8,3
(Elektrodenpuffer für Disk-Elektrophorese)

6 g Tris und 28,8 g Glycin werden in 1 l bidest. Wasser gelöst. Von dieser Lösung werden 200 ml auf knapp 2 l mit bidest. Wasser aufgefüllt und der pH bei R.T. auf 8,3 eingestellt.

Puffer Nr.6 : TRIS-Puffer pH 8,3
(Sammelgelpuffer für Disk-Elektrophorese)

5,7 g TRIS und 0,46 TEMED werden in 100 ml bidest. Wasser gelöst und mit konz. Phosphorsäure auf pH 8,3 eingestellt.

Puffer Nr.7 : TRIS-Puffer pH 8,9
(Trenngelpuffer für Disk-Elektrophorese)

36,6 g TRIS und 0,23 g TEMED werden in 100 ml bidest. Wasser gelöst und mit konz. Salzsäure auf pH 8,9 eingestellt.

Puffer Nr.8 : TRIS-Puffer pH 7,1 - 9,0
(C.A.-Elektrophoresen)

Lösung I : 0,2 M TRIS-Lösung (24,2 g TRIS/l)
Lösung II : 0,2 M Salzsäure (200 ml 1 N HCl/l)
Lösung III: 0,2 M Natriumchlorid (11,6 g NaCl/l)

Mit diesem 3-Komponentensystem lassen sich Puffer mit pH-Werten zwischen 7,1 und 9,0 bei konstanter Ionenstärke herstellen. Dabei wird mit II der pH eingestellt und mit III die Ionenstärke korrigiert.

z.B.:pH 7,3: 500 ml I + 400 ml II + 1100 ml dest.Wasser
pH 9,0: 500 ml I + 50 ml II + 350 ml III +
1100 ml dest.Wasser

Puffer Nr.9 : Ammoniumacetatpuffer

Eisessig wird vorgelegt, mit dest. Wasser auf ca. 950 ml aufgefüllt, mit konz. Ammoniak auf den gewünschten pH eingestellt und mit dest. Wasser genau auf 1 l aufgefüllt.

z.B Ammoniumacetatpuffer (0,1 M): 120,1 g Eisessig mit dest. Wasser auf 950 ml verdünnt und mit konz. $NH_3$ den gewünschten pH eingestellt. (Eisessig als 100%ig angenommen)

Puffer Nr.10: Michaelis' Barbital-Na-Acetatpuffer pH 8,3

Lösung I: 4,69 g Natriumacetat und 11,78 g Barbital werden in je 200 ml dest. Wasser gelöst. Zu der Barbitalsuspension wird solange 6 N NaOH zugetropft, bis sich das Barbital löst. Beide Lösungen werden vereinigt.

Lösung II: 0,1 N Salzsäure

Lösung I wird mit Lösung II auf den gewünschten pH (8,3) eingestellt und auf 2 l aufgefüllt.

## 2.4. Analytische Methoden

### 2.4.1. Aminosäureanalysen

Ca. 1mg Peptid wird im Hydrolysenrohr mit 2ml halbkonzentrierter Salzsäure versetzt und 5 Min. mit Stickstoff begast. Das Rohr wird zugeschmolzen und 24 bis 72 Stdn. im Ölbad bei 110°C erhitzt. Das Hydrolysat wird im Exsikkator über feuchtem KOH getrocknet.

### 2.4.2. Elementaranalysen

Hierzu werden ca. 10 mg Substanz über $P_2O_5$/KOH bei 60°C in der Trockenpistole getrocknet.

### 2.4.3. Spezifische Drehwerte

Sie werden bei 20-25°C und den Wellenlängen 546,1 nm und 577,8 nm gemessen und auf die Natrium-D-Linie extrapoliert. Fehlergrenze $\pm$ 0,5°.

### 2.4.4. Schmelzpunkte

Die erhaltenen Werte sind nicht korrigiert.

### 2.4.5. Dünnschichtchromatographie

Sie wird auf Kieselgel-Aluminium- und Cellulose-Aluminium-Platten mit und ohne Fluoreszensindikator durchgeführt. Folgende Laufmittelsysteme werden verwendet:

Laufmittelsystem Nr. 1

n-Butanol/Eisessig/Wasser (4 : 1 : 1)

Laufmittelsystem Nr. 2

n-Butanol/Pyridin/Eisessig/Wasser (30:20:6:24)

Laufmittelsystem Nr. 3

Chloroform/Methanol/Essigsäure (90: 5 : 3)

Die Entwicklung der Platten erfolgt mit:

1. Ninhydrin (freie und Boc-geschützte Aminogruppen)

Sprühreagenz: 0,2g Ninhydrin in einem Gemisch von 95 ml n-Butanol und 5 ml Eisessig gelöst.
Langsames Erhitzen des Chromatogramms im Trockenschrank oder mit Föhn auf ca. 110°C.

2. Pauly Diazo-Reagenz (Histidin und Tyrosin)

Sprühreagenz: 5g Sulfanilsäure werden in 50ml 25% HCl gelöst. Diese Lösung wird auf 1000 ml aufgefüllt (Lsg.1). 28g $NaNO_2$ in 100ml Wasser gelöst (Lsg.2). Gesättigte $K_2CO_3$-Lösung (Lsg.3).
Lsg.1 und 2 im Verhältnis 1:1 mischen, 2 Min. stehen lassen dann 2 Vol. $K_2CO_3$-Lsg. zugeben, mischen und damit Chromatogramm besprühen.

3. Sakaguchi (Arginin)

Sprühreagenz I: 0,1% α-Naphtol in 1N NaOH
SprühreagenzII: 5% wäss. NaOH, vor Gebrauch mit $Br_2$ versetzt (100 ml Lauge + 2ml Brom)
Chromatogramm nacheinander mit I und II besprühen.
Anfärbung gelingt auf Cellulose-Platten besser als auf Kieselgel-Platten.

4. Reindel-Hoppe (Säureamid, Peptidbindung)

Lösung 1: 16 ml 10-14% Javel-Lauge (K-hypochlorid) mit dest. Wasser auf 100 ml aufgefüllt. Vor Alkohol-und Acetondämpfen schützen; einige Wochen haltbar.
Lösung 2: 10% Essigsäure
Lösung 3: 100 ml 2% Essigsäure mit o-Tolidin sättigen, dann abnutschen. 840mg KJ in 100 ml Wasser lösen. Beide Lösungen im Verhältnis 1:1 mischen(einige Wochen haltbar).
Chromatogramm mit Lsg.1 leicht besprühen, dann 20 bis 100 Min. bei R.T. stehen lassen. Danach gründlich mit Lsg.2 besprühen. Zuletzt mit Lsg.3 besprühen.

Für die Dünnschichtchromatogramme der Säulenelutionen werden pro Fraktion mit Konstriktionspipette 10 bzw. 20 ul aufgetragen. Laufzeit ca. 5 Stdn.

## 2.4.6. Elektrophoresen

### 2.4.6.1. Papierelektrophorese

Die Elektrophorese wurde im allgemeinen auf 8 x 30 cm großen Chromatographiepapier-Streifen in der Shandonkammer durchgeführt.
Als Puffer diente: Puffer Nr.10 (siehe 2.2.2.)

Laufzeit: 12 Stdn.
Spannung: 110 V (2-4 mA)

Anfärbung Protein : Amidoschwarz 0,2 %ig in MeOH/AcOH (9:1); 1/2 bis 1 Min.
Entfärbung : in MeOH/AcOH (9:1)

Esterasen-Staining: Papierstreifen wird mit Triacetinemulsion, 50%ig in Lösung I (3.12.1.), besprüht und unter Luftabschluß 30 Min. inkubiert. Beim Besprühen mit Methylrotlösung (pH 8,0) zeigt sich Esterase als roter Fleck.

### 2.4.6.2. Elektrophorese auf Celluloseacetat-Folie

Die Elektrophorese wird in der Shandonkammer durchgeführt. Der Kontakt zwischen C.A.-Streifen (4 x 13 cm) und Pufferflüssigkeit wird durch puffergetränktes Elektrophresepapier hergestellt.

Als Puffer wurden verwendet: Puffer Nr.8, 10 u. 11

Laufzeit: 2-3 Stdn.
Spannung: bei Puffer Nr. 8 200 V (2,5-6 mA)
sonst 100 V (3,5-5,2 mA)

Anfärbung Protein : Coomessie Blue 2%ig in MeOH/AcOH (9:1)
Entfärbung: in MeOH/AcOH (9:1)

Esterasen-Staining: Diazo-Fuchsin-Methode (49)

Lösung I: 130 mg $NaNO_2$ in 5 ml dest. Wasser
Lösung II: 120 mg Fuchsin in 4 ml 1 N HCl
Lösung III: α-Naphtolacetat 1%ig in Aceton
Lösung IV : 0,1 M TRIS-HCl-Lsg. pH 7,0

In 200 ul Eiswasser werden je 200 ul der Lösungen I u. II gegeben. Diese Mischung wird in 50 ml Lösung IV aufgenommen. Nach Zugabe von 400 ul Lösung III ist das Reagenz gebrauchsfertig. Der C.A.-Streifen wird in das Reagenz eingetaucht.

Anm.: Das Reagenz eignet sich auch vorzüglich zu Austesten von Säulenchromatographie-Eluaten. Hierzu werden aus jeder Fraktion mit einer Konstriktionspipette 50 ul auf einen Chromatographiepapier-Streifen getüpfelt. Dieser Streifen wird zur Entwicklung in das Reagenz eingetaucht.

### 2.4.6.3. Analytische Disk-Elektrophorese

Zur analytischen Disk-Elektrophorese auf Polyacrylamidgel wird das Gelsystem Nr.1a nach MAURER ( 50 ) mit dem 7%-Gel verwendet:

Sammelgel:
- 1 Teil Puffer Nr.6 (2.2.2.)
- 2 Teile Acrylamid (10 g Acrylamid + 2,5 g Bis pro 100 ml)
- 1 Teil Riboflavin (4,0 mg/100 ml)
- 4 Teile Saccharose (40,0 g/100 ml)

Trenngel:
- 1 Teil Puffer Nr.7 (2.2.2.)
- 2 Teile Acrylamid (28 g Acrylamid + 0,735 g Bis pro 100 ml)
- 1 Teil Wasser
- 4 Teile Ammoniumpersulfat (0,14 g/100 ml)

Als Elektrodenpuffer wird Puffer Nr.5 verwendet. Zur Frontanfärbung dient Bromphenolblau.

Die Trennung erfolgt zunächst 2 Min. bei 50 V dann 40 Min bei 150 V und ca. 20 mA.

Bei der Verwendung der Flachgelapparatur von Desaga betrug die Laufzeit 3 1/2 Stdn. Die Trennung verlief solange das Protein im Sammelgel war bei 200 V (ca.50 mA), dann im Trenngel, also während der längsten Zeit der Elektrophorese bei 400 V (ca.50 mA).

Nach der Elektrophorese werden die Gele entnommen und der Proteinanfärbung oder der Aktivitätsanfärbung zugeführt.

Proteinanfärbung: Coomassie Blue (2.4.6.2.)
Esterasenanfärbung: Diazo-Fuchsin-Methode (2.4.6.2.)

## 2.4.7. Umsatzkontrolle durch Ninhydrintest

Der Reaktionslösung wird ein Aliquot (ca. 10 µMol) entnommem und mit Diäthyläther gefällt und gewaschen. Der Rückstand wird mit 2 ml Stein-Moore-Reagenz ( 51 ) versetzt und 15 Min bei 80°C erhitzt. Nach Abkühlen unter fließendem Wasser wird mit 8 ml 50%iger wäßriger n-Propanollösung versetzt, filtriert und die Extinktion bei 570 nm gemessen.

## 2.4.8. Bestimmung des Acetylgehalts von Celluloseacetat (Best. des DS von Celluloseacetat)

Der Acetylgehalt wird durch milde Verseifung der Esterbindungen bestimmt. Die Bestimmung kann sowohl in Lösung als auch unter heterogenen Bedingungen durchgeführt werden.
Die Standard-Methode nach Eberstadt (52) wird wie folgt durchgeführt:
Die gründlich getrocknete Probe (ca.1g) wird in einem 250 ml Erlenmeyer mit 40 ml 75% Äthanol versetzt. Dieser Kolben sowie ein Reagenzienleerwert werden 30 Min. auf 50-60°C erhitzt. Dann werden in jeden Kolben genau 40ml 0,5N NaOH gegeben und die Mischung ca. 48 Stdn. bei R.T. stehen gelassen. Das überschüssige Alkali wird dann mit 0,5 N HCl rücktitriert (keine Glaselektrode sondern Phenolphtalein benutzen). Um dem in der regenerierten Cellulose noch vorhandenen Alkali Gelegenheit zu geben, heraus zu diffundieren, wird ein Überschuß von ca. 1ml HCl zugegeben und über Nacht stehen gelassen. Der kleine Überschuß an Säure kann danach wieder mit 0,5N NaOH rücktitriert werden.

Gleichung zur Berechnung des Acetylgehalts:

$$\% \text{ Acetyl} = \left[(A - B)\, N_b - (C - D)\, N_a\right] \times 4{,}3/W$$

A = ml NaOH-Zugabe zur Probe
B = ml NaOH-Zugabe zum Leerwert
$N_b$ = Normalität der NaOH-Lösung
C = ml HCl-Zugabe zur Probe
D = ml HCl-Zugabe zum Leerwert
$N_a$ = Normalität der HCl-Lösung
W = Gewicht der Probe in g
4,3= Faktor zur Berechnung von % Acetyl, Äquivalentgewicht 43

Gleichung zur Berechnung des Substitutionsgrades (53):

$$DS = \frac{3{,}86 \times \% \text{ Acetyl}}{102{,}4 - \% \text{ Acetyl}}$$

## 2.4.9. Bestimmung der Cellulase-Aktivität (54)

### 2.4.9.1. Bestimmung mit der DNS-Methode

Die Reaktionsmischung enthält:
100 mg CMC in 10 ml 0,1 M Acetatpuffer (pH 5,0) gelöst sowie 2,5 ml Enzymlösung (3mg/ml). Um das Wachstum von Mikroorganismen zu verhindern wird die Reaktionsmischung mit Merthiolat versetzt (77). Reaktionstemperatur ist 50°C.

Der Start der Reaktion erfolgt durch Zugabe der Enzymlösung zu der vorgewärmten Substratlösung. Nach genau einer Minute werden 500 ul aus der Reaktionsmischung entnommen und in 3 ml DNS-Reagenz pipettiert. Im alkalischen Milieu des DNS-Reagenz werden die Enzyme inaktiviert. Der Gehalt an reduzierenden Zuckern kann photometrisch bestimmt werden (2.4.14)

Leerwert:
Wird die CMC-Lösung zuerst mit dem Reagenz und dann mit der Enzymlösung versetzt, so ergibt sich nach gleicher Weiterbehandlung der O-Min.-Wert. Vom Reagenz wird also nur mit den schon in der Testlösung vorhandenen reduzierenden Stoffen der Farbstoff gebildet. Bei Messung gegen diesen jeweiligen Leerwert ergibt sich die reine Enzymaktivität.

Definition der Aktivität:

µMol reduzierende Zucker (ausgedrückt als Glucose), die in 1 Min von dem Enzymmaterial unter den gegebenen Bedingungen gebildet werden (54).

### 2.4.9.2. Bestimmung durch Viskosimetrie

Die Reaktionsmischung enthält:
25 mg CMC in 10 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer (pH 5,0) gelöst sowie 1 ml Enzymlösung. Diese Mischung wird ebenfalls mit Merthiolat versetzt. Reaktionstemperatur ist 40°C.

Die CMC-Lösung wird in einem Reagenzglas auf 40°C erwärmt. Durch die Zugabe der Enzymlösung wird die Reaktion gestartet. Die Reaktionsmischung wird dann in das ebenfalls vor-

gewärmte Viskosimeter gegossen. Zu bestimmten Zeiten wird die Viskosität der Lösung bestimmt. Die Reaktionszeit ergibt sich aus der Zeit bis zum Beginn der Messung zuzüglich der halben Durchlaufzeit (54 ).

Zur Bestimmung des Nullminuten-Wertes wird die Viskosität einer Lösung bestimmt, die sich von der Reaktionsmischung nur durch das Fehlen des Enzyms (statt Enzymlösung wird Puffer zugegeben) unterscheidet.

Definition der Aktivität:

Die Abnahme der spezifischen Viskosität (ausgedrückt in % der ursprünglichen Viskosität der Lösung), die das Enzymmaterial unter den gegebenen Bedingungen in 10 Min. verursacht.

2.4.10. Bestimmung der Esterasen-Aktivität (95)

24 g NaCl (0,41 M) + 15 g Na-Oxalat (0,11 M) werden mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH wird genau auf 7,0 eingestellt.

(20 - x) ml dieser Lösung werden im thermostatisierten Reaktionsgefäß vorgelegt. x ml Enzymlösung werden zugegeben. Nach Neutralisation wird die Reaktion durch Zugabe von 1ml Triacetin (Glycerintriacetat) gestartet. Durch Zugabe von 0,01 N NaOH (pH-Stat) wird der pH auf 7,0 gehalten. Der Verbrauch an Natronlauge gibt die Menge an freigesetzter Essigsäure an.

Definition:
1 Acetylesteraseneinheit ist die Menge Enzym, die aus 20ml einer 5% Triacetinlösung bei 30°C in Gegenwart von 0,15 M NaCl bei pH 6,5 1 Milliäquivalent Acetylgruppen/Min. freisetzt.

2.4.11. Bestimmung proteolytischer Aktivität (55)

500mg Hide-Powder-Azure B werden in 50ml Trispuffer 0,05 M, 0,1 M NaCl, 15 mM $Ca^{2+}$, pH 7,4 mit Ultraturrax homogenisiert. Am Ultratorax hängendes Material wird durch mehrmaliges kurzes Laufenlassen in insgesamt 50 ml Puffer aufgenommen. Homogenat und Spülpuffer werden vereinigt(Gesamtmenge 100ml).

Zu der Suspension werden entweder geringe Mengen festen Lyophilisates mit Enzym oder Enzymlösungen gegeben (0,1-0,5 ml/ 1ml Suspension). Die gekühlten Testansätze (verschlossene Reagenzgläser) werden bei 37°C inkubiert und leicht geschüttelt. Nach 30 Min. wird in Eiswasser abgekühlt und 15 Min. bei 1100 x g zentrifugiert. Die Überstände werden in 1 ml Küvetten bei 595 nm gegen Puffer gemessen.

Blindwerte: a) nur Substratlösung
b) dem Substrat wird nach der Inkubation (vor der Zentrifugation)Enzym zugegeben.

## 2.4.12. Bestimmung der biologischen Aktivität der Angiotensin II - Präparate

Die Bestimmung erfolgte mit einigen Abwandlungen nach der von Dekanski ( 56 ) für die Bestimmung von Vasopressin und Angiotensin entwickelten Blutdruckmethode.

1. Anästhesie

Eine Albino-Ratte mit einem Körpergewicht von 250-300 g wird mit einer intraperitonealen Injektion von 0,45 ml einer 25% (w/v) wässrigen Urethanlösung anästhesiert.

2. Operative Präparation

Das Tier wird nach ca. 30 Min (keine Reflexe) in Rückenlage auf dem Operationstisch befestigt. Der Einschnitt erfolgt entlang der Mittellinie des Tieres etwa von der Höhe der Larynx bis oberhalb des Brustbeins. Die Haut wird auseinandergebreitet und die Halsschlagader ( A. carotis) freigelegt und mit einem Seidenfaden abgebunden. Die linke äußere Halsvene (V. jugularis) wird isoliert und mit einem Polyäthylenröhrchen kanüliert. Durch diese Kanüle werden sämtliche weiteren Injektionen durchgeführt. So auch die nun folgende Injektion von 500 Units Heparin. Um den Blutdruck registrieren zu können, wird die Karotis isoliert und ebenfalls mit einem Polyäthylenröhrchen kanüliert. Zur Erleichterung der Atmung wird ein kleiner Einschnitt in die Trachea gemacht, ein Polyäthylen - röhrchen eingesetzt und befestigt. Auf Länge der Kanüle achten! Die Arterienkanüle wird mit einem Drucküber-tragungssystem verbunden, die Überwachung des arteriellen Druckes beginnt.

3. Vorbehandlung mit Phenoxybenzamin (Dibenzylen)

0,1 ml einer Dibenzylen-Lösung werden pro 100 g Körpergewicht i.v. injiziert (langsam!). Alternativ kann auch am Tag vor dem Test 1 ml/ 100 g Körpergewicht i.p. injiziert werden. Die Dibenzylen-Lösung wird wie folgt hergestellt: 10 mg Dibenzylenpulver werden in 2 ml einer salzsauren Kochsalzlösung (0,154 M NaCl u. 0,1 N HCl) gelöst. Diese wird mit 10 ml einer 0,154 M NaCl-Lösung verdünnt.
Diese Vorbehandlung erfolgt aus folgenden Gründen:

a. In einer unbehandelten Ratte bewirkt die i.v. Injektion von 0,1-0,5 ml einer 0,9% Kochsalzlösung (das erlaubte Injektionsvolumen) eine Druckreaktion. Diese Reaktion kann durch Dibenzylen verhindert werden ( 57 ).

b. Dibenzylen und Dibenamin unterdrücken die normalen Druckantworten auf Adrenalin, Noradrenalin, Hydroxytyramin, Nikotin und Piperidin ( 58 ).

Bei der Durchführung der Injektionen, für die eine Spritze mit der Venenkanüle verbunden wird, muß streng darauf geachtet werden, daß keine Luft mitinjiziert wird, da die kleinste Luftblase zu einer Embolie führen kann.

4. Testvorgang

Da kein geeichter Angiotensin-Standard zur Verfügung stand, wurden die getesteten Proben gegen einen Vasopressin-Standard gemessen. Lediglich ein klassisch synthetisiertes $Val^5$-Angiotensin II, welches mir von Herrn M.Caviezel zur Verfügung gestellt wurde, wurde mitgetestet.
Um die Sensitivität des Tieres zu testen, wird zunächst ein Volumen Kochsalzlösung injiziert, welches dem größten der verwendeten Volumen des Vasopressin-Standards entspricht. Danach folgt die Injektion des gleichen Volumens des Vasopressin-Standards. Es muß sich ein klarer Unterschied im Ausmaß der Antworten auf diese Injektionen zeigen. In der Praxis injiziert man 0,2 ml Kochsalzlösung gefolgt von

0,2 ml des Vasopressin-Standards. Eine sensitive Ratte wird praktisch keine Antwort auf die Kochsalzinjektion, dagegen eine klare Antwort auf den Vasopressin-Standard geben.

5. Auswertung

Die Druckantwort wird von einem Schreiber aufgezeichnet. Zur Erstellung einer Eichkurve werden hintereinander drei verschiedene Dosen des Vasopressin-Standards injiziert. Die entsprechenden Vasopressineinheiten werden gegen die Höhen der Zeigerausschläge auf halblogarithmischem Papier aufgetragen. Durch Vergleich der Zeigerausschläge beim Testen der Proben können die Einheiten der getesteten Proben aus der Eichkurve abgelesen werden.

## 2.4.13. Proteinbestimmungen

### 2.4.13.1. Biuret-Proteinbestimmung (59)

150mg $CuSO_4$ x 5 $H_2O$ und 600mg Kaliumnatriumtartrat werden in 50ml dest. Wasser gelöst und in 30ml carbonatfreie 10% NaOH (w/w) eingerührt, dann 200mg KJ zugefügt, um Autoreduktion zu verhindern. Die Lösung wird mit 10% NaOH auf 200ml aufgefüllt.

Je 1ml der Proteinlösungen wird mit kalter 20% TCA versetzt, gut durchgeschüttelt und nach 5 Min. in der Kälte zentrifugiert (3000 x g, 10 Min.). Der Überstand wird abdekantiert, 1ml kaltes Wasser dazugegeben und schnell wieder abdekantiert. Der Niederschlag wird in 1ml Wasser bei R.T. suspendiert und durch Zugabe von 1ml Reagenz gelöst. Dann werden weitere 4ml Reagenz zugegeben und nach 30 Min. die Extinktion bei 555 nm gemessen.

Bei reinen Proteinlösungen und bei wenig durch reduzierende Substanzen verunreinigte Lösungen braucht keine TCA-Fällung zu erfolgen. Das Biuret-Reagenz kann dann sofort zur Lösung zugegeben werden.

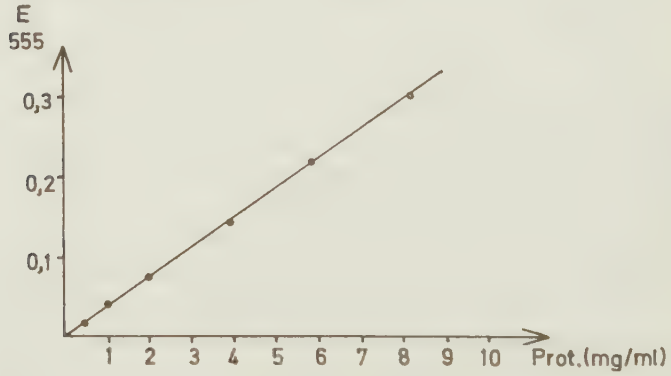


Abb.2 Eichkurve Biuret-Proteinbestimmung (RSA)

2.4.13.2. Proteinbestimmung nach Lowry (60)

Lsg.1: Wäßrige 2% Natriumcarbonatlösung (g/v)
Lsg.2: 0,05g Kupfersulfat und 0,10g Natriumtartrat werden in 10,0ml dest. Wasser gelöst.
Lsg.3: Alkalische Kupfersulfatlösung. 50ml Lösung 1 werden mit 1ml Lösung 2 gemischt.
Lsg.4: Phenolreagenz nach Folin-Ciocalteu. Das käufliche Reagenz wird mit dest. Wasser 1:2 verdünnt (v/v). Gegen Phenolphtalein soll die Säurekonzentration ca. 1 N betragen.
Lsg.5: Protein-Standard: 0,5mg RSA/ml

Die Entfernung der Verunreinigungen erfolgt analog zu 2.4.13.1. durch TCA-Fällung. Der TCA-Niederschlag wird leichter in 1 N NaOH gelöst und gegebenenfalls mit dest. Wasser verdünnt.

0,2 ml Probelösung und 1,0 ml Lösung 3 werden gut gemischt und 10 Min. stehengelassen. Danach werden 0,1 ml Lösung 4 zugegeben, innerhalb 1-2 Sek. mischen, 30 Min. bei R.T. belassen und dann die Extinktion (500 nm) gemessen.

Die Extinktion des Probeansatzes sei $E_x$, die des Kontrollansatzes $E_o$ und die des Standardansatzes $E_{St}$. Die Konzentration des Proteins in der Probe wird wie folgt ermittelt:

$$\text{Protein (ug/ml)} = \frac{E_x - E_o}{E_{St} - E_o} \times 0{,}5 \times V$$

## 2.4.14. Bestimmung der reduzierenden Zucker

Wegen des alkalischen Milieus in dem sie durchgeführt wird, eignet sich hierfür besonders gut die Dinitrosalicylat(DNS)-Methode( 54,61 ).

DNS-Reagenz:
10 g 3,5-Dinitrosalicylsäure, 2g Phenol, 0,5 g Natriumsulfit und 200 g Kaliumnatriumtartrat werden in ca. 800 ml 2% NaOH gelöst und dann auf 1000 ml aufgefüllt.

2 ml Probenlösung + 3 ml DNS-Reagenz werden 2 Min. mit Stickstoff begast und anschließend 15 Min. im siedenden Wasserbad erhitzt. Danach wird unter fließendem Wasser rasch abgekühlt. Die Extinktion wird bei 540 nm gegen einen Nullwert gemessen, der statt der Probenlösung 2 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,0 enthält.

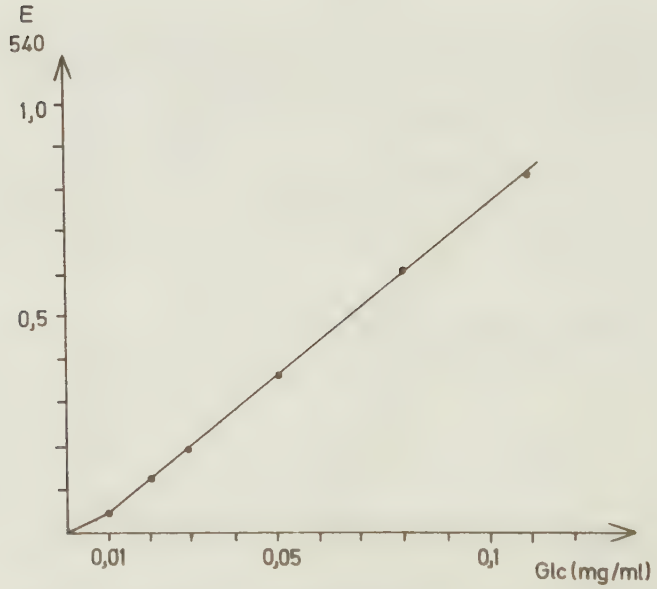


Abb.3 Eichkurve DNS-Methode

2.4.15. Abschätzung des Molekulargewichts

2.4.15.1. Durch Bestimmung des Verteilungskoeffizienten auf einer Sephadex G-75 - Säule

Die Säule (1,9 x 117cm) wird mittels einer Suspension aus Sephadex G-75 superfine und 0,01 M Ammoniumacetatpuffer gefüllt (Bettvolumen($V_t$) = 320 ml). Die Durchlaufgeschwindigkeit wird auf 0,5 ml/Min eingestellt.

Zur Bestimmung des Ausschlußvolumens werden 2 ml einer 0,2 % Dextranblaulösung aufgetragen und die Elution am Uvicord überwacht. Das Elutionsvolumen beim Maximum des Elutionspeaks ergibt das Ausschlußvolumen ($V_a$ = 108 ml).

Das mittlere Elutionsvolumen ($V_e$) des Enzyms wird durch wiederholte Läufe über diese Säule ermittelt. Aufgetragen werden jeweils ca. 200 mg in 2 ml dest. Wasser.

Der Verteilungskoeffizient ($K_{av}$) kann aus diesen Werten wie folgt berechnet werden:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_a}{V_t - V_a}$$

Daraus ergibt sich aus der Eichkurve ( 62 ) der Wert für das Molekulargewicht.

2.4.15.2. Durch Gelchromatographie an einer geeichten Sephadex G-150 - Säule (62)

Auf einer Sephadex G-150 - Säule (1,0 x 100 cm) werden bei 4°C 0,5 ml einer Lösung chromatographiert, die in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,0 2 mg Acetylesterasen-Lyophilisat enthält. Zuvor wurde diese Säule durch Chromatographie einer Lösung von 2 mg Malatdehydrogenase ( 65 000 daltons) und 1 mg Cytochrom C ( 13 000 daltons) in 0,1 M Tris-Puffer pH 7,0 geeicht. Das Elutionsvolumen des jeweiligen Maximums war 52,5 bzw.

78 ml. Die Acetylesterase wird mit Hilfe der Diazo-Methode (2.4.6.2.) lokalisiert. Die Abschätzung des Molekulargewichts erfolgt graphisch durch halblogarithmisches Auftragen der Molekulargewichte gegen die Elutionsvolumina.

### 2.4.16. Bestimmung des isoelektrischen Punktes

#### 2.4.16.1. Elektrophoresen auf C.A.-Folie

Die Abschätzung erfolgte durch Bestimmung der elektrophoretischen Beweglichkeiten bei verschiedenen pH. Die Elektrophoresen werden wie unter 2.4.6.2. beschrieben, mit Puffern verschied. pH (Tris-Puffer Nr.8) durchgeführt. Proteine werden durch Coomassie Blue, die Acetylesterase durch die Diazo-Methode (2.4.6.2.) sichtbar gemacht. Der Effekt der Elektroosmose bleibt bei dieser groben Abschätzung unberücksichtigt (63).

#### 2.4.16.2. Elektrofokussierung

Die Bestimmung wird mit Hilfe einer Fokussiersäule nach Harzer ( 64 ) durchgeführt. Die mit einem Kühlmantel umgebene Glassäule, in der die Fokussierung stattfindet, ist mit einem Schlauch verbunden, sodaß eine U-förmige Anordnung entsteht. Die beiden Schenkel dieses Gerätes stehen in hydrostatischem Gleichgewicht.

Zunächst wird die Kühlung der Säule durch Anschluß des Kühlmantels an die Wasserleitung ($12^{o}C$) eingeschaltet. Dann wird der Kathodenraum mit 1,5 % Äthylendiamin in 50 % Saccharose gefüllt. Dabei wird die Lösung in das U-förmige Gerät gegossen und der Kathodenschenkel so weit abgesenkt, daß die Lösung bis zu dessen oberer Öffnung reicht. Nun wird dieser Schenkel durch Abklemmen der Öffnung verschlossen und in die ursprüngliche Stellung gebracht. In den

noch leeren Elektrofokussierraum wird nun mit Hilfe eines Gradientenmischgerätes ein Gradient aus 7 ml 20 % Saccharose und 7 ml Enzymlösung (0,2 ml Amphilinkonzentrat (pH 3 - 10) + 2 mg Enzymlyophilisat in dest. Wasser) eingefüllt. Der Anodenraum wird durch Überschichten dieser Dichtelösung mit 4 ml 0,1 % Schwefelsäure gefüllt.
Nach 18 Stdn. bei 450 - 550 V wird die Fokussierung beendet, der Kathodenschenkel oben verschlossen und der Inhalt der Fokussiersäule durch eine Kapillare und einen Schlauch ablaufen gelassen. Der Auslauf wird in Fraktionen zu je 10 Tropfen getrennt. Mit einer Mikro-Glaselektrode wird der pH der einzelnen Fraktionen gemessen. Anschließend wird von jeder Fraktion zur Lokalisierung der Acetylesterase mit einer Kapillare ein Tüpfel auf Filterpapier gemacht und mit der Diazo-Methode (2.4.6.2.) entwickelt.

## 2.5. Darstellung und Eigenschaften der verwendeten Aminosäurenderivate

### 2.5.1. Darstellung von Boc-Aminosäuren

0,5 Mol Aminosäure werden in ca. 240 ml Wasser/Dioxan (1:1) suspendiert und mit einem leichten Überschuß an Boc-Azid (160 ml einer 4 M Boc-Azid-Lösung in Dioxan) versetzt und unter kräftigem Rühren mit ca. 4 N NaOH am pH-Stat bei dem jeweils erforderlichen pH titriert. Die Reaktion ist je nach Aminosäure nach 2-3 Stdn. oder nach mehreren Tagen beendet. Die gelbe Lösung bzw. Emulsion wird am Rotationsverdampfer bei 30°C so weit eingeengt, daß das Dioxan entfernt ist. Die wäßrige Lösung des Boc-Aminosäure-Na-Salzes wird zur Entfernung des überschüssigen Boc-Azids 3 x mit Äther extrahiert und anschließend unter Eiskühlung mit fester Zitronensäure bis pH 2-3 angesäuert, wobei das Produkt meistens ölig ausfällt oder bei guter Wasserlöslichkeit gelöst bleibt. Die dabei auch freigesetzte Stickstoffwasserstoffsäure wird unter Eiskühlung am Rot. vap. entfernt. Die Boc-Aminosäure wird dann mit Essigester 4-5 mal extrahiert. Die vereinigten Essigester-Phasen werden mit halbgesättigter NaCl-Lösung säurefrei gewaschen, mit Magnesiumsulfat/Aktivkohle getrocknet und am Rot.vap. eingeengt, wobei ein hellgelbes Öl zurückbleibt, das mit EE/PÄ zur Kristallisation gebracht wird. Gelingt dies nicht, wird durch langsames Zufügen der äquivalenten Menge (höchstens 10% Überschuß) von Dicyclohexylamin zu der konzentrierten Essigesterlösung unter Eiskühlung und Zugabe von PÄ bis zur leichten Trübung das kristalline DCHA-Salz erhalten.

### 2.5.2. t-Boc-Azid ( 65 )

Boc-Azid wird in Ausbeuten zwischen 90 und 98% aus t-Boc-Hydrazid hergestellt und als 4 M Lösung in Dioxan aufbewahrt. $C_5H_9N_3O_2$ (143,2)

2.5.3. Boc-Ala-OH ( 66 )

Ausbeute: 90% d.Th. $C_8H_{15}NO_4$ (189,2)

Fp.: 82°C (Lit. 82-84°C) Ber.: C 50,74 H 7,93 N 7,40
Gef.: C 50,88 H 8,03 N 7,28

$(\alpha)_D^{25} = -12,6^\circ$ (Lit.: $-12,2^\circ$) (c = 1; Dioxan)

2.5.4. Boc-Arg(Tos)-OH (67, 68, 66 )

Ausbeute: 20% d.Th. (über alle Stufen) $C_{18}H_{28}N_4O_6S$ (428,5)

Fp.: 98°C (Lit. 98-100°C) Ber.: C 50,40 H 6,53 N 13,07
Gef.: C 50,18 H 6,50 N 12,30

$(\alpha)_D^{25} = -9,8^\circ$ (Lit.: $-3,3^\circ$) (c = 4; Dioxan)

2.5.5. Boc-Gly-OH ( 66 )

Ausbeute: 98% d.Th. $C_7H_{13}NO_4$ (175,2)

Fp.: 93°C (Lit. 93-95°C) Ber.: C 47,99 H 7,48 N 8,00
Gef.: C 47,87 H 7,34 N 7,61

2.5.6. Boc-Asp(OBzl)-OH ( 69, 66, 70 )

Ausbeute: 45% d.Th. (über alle Stufen) $C_{16}H_{21}N_1O_6$ (323,5)

Fp.: 100,5-101,5°C (Lit. 99,5-101°C)
Ber.: C 59,43 H 6,54 N 4,33
Gef.: C 59,43 H 6,55 N 4,13

$(\alpha)_{578}^{22} = +7,1^\circ$ (c = 1; AcOH)

2.5.7. Boc-Ile-OH ( 66 )

Ausbeute: 96% d.Th. $C_{11}H_{21}N\,O_4$ (231,4)

Fp.: 68-69°C (Lit. 66-68°C) Ber.: C 57,12 H 9,15 N 6,05
Gef.: C 57,01 H 8,17 N 6,12

$(\alpha)_D^{20} = +2,2^\circ$ (Lit. $-2,5^\circ$) (c = 1; AcOH)

## 2.5.8. Boc-His(Dnp)-OH

### 2.5.8.1. H-His-OMe-2 HCl (71)

Ansatz: 40 g L-His-2 HCl (175 mMol)
600 ml Methanol abs.
5,3 ml konz. Schwefelsäure

Das Histidin wird im Methanol aufgenommen. Zu dieser Mischung gibt man die Schwefelsäure und erhitzt 2 Stdn. bei 80°C am Rückfluß. Danach läßt man auf R.T. abkühlen. In die klare Lösung wird nun trockenes HCl-Gas eingeleitet. Nach 5 Stdn. wird abgebrochen. Beim Stehenlassen über Nacht (bei 0-5°C) kristallisiert der Histidinmethylester aus. Die Mutterlauge wird am Rot.vap. auf ca. 1/5 eingeengt und bei 0-4°C stehengelassen. Die weißen Kristalle werden 1 Std. in abs. MeOH am Rückfluß gekocht. Nach dem Abkühlen wird abgesaugt und mit frischem MeOH nachgewaschen. Das MeOH wird durch digerieren mit Äther entfernt. Danach wird i.V. getrocknet.

Ausbeute: 37,4 g (170 mMol) = 95% d.Th.

$C_7H_{13}N_3O_2Cl_2$ M.G.: 242,1 Fp.: 190-192°C
(Lit.:198°C)

### 2.5.8.2. Boc-His-OMe (72)

Ansatz: 24,2 g H-His-OMe-2 HCl (100 mMol)
28,6 g t-Butyloxycarbonyl-azid (200 mMol)
100 ml Chloroform
40 ml $NH_3$-Chloroform
40 ml Pyridin

Die Suspension des H-His-OMe-2 HCl in Chloroform wird auf 0°C abgekühlt und unter Rühren mit $NH_3$-$CHCl_3$ versetzt. Nach ca. 30 Min wird vom $NH_4Cl$ abfiltriert, das Filtrat i.V. vom Lösungsmittel befreit und der ölige Rückstand mit

Pyridin und Boc-Azid versetzt. Nach 84 Stdn. bei R.T. wird die Lösung i.V. eingeengt, der Rückstand mit Äther/PÄ (1:2) versetzt und in der Kälte der Kristallisation überlassen. Aus EE/Äther bzw. EE/PÄ (die zunächst ausfallenden braunen Schmieren werden abfiltriert) erhält man reinen Boc-His-OMe.

Ausbeute: 24 g (89 mMol) = 97% d.Th., $C_{12}H_{19}N_3O_4$ M.G. 269,31

Fp.: 123°C (Lit.:124-125°C) $(\alpha)_D^{20} = -11,8^\circ$ (c=2; Pyridin)

(Lit.: $(\alpha)_D^{20} = -13,6^\circ$)

2.5.8.3. Boc-His(Dnp)-OH (73)

Ansatz: 27 g Boc-His-OMe (100 mMol)
21 g 2,4-Dinitrofluorbenzol (113 mMol)
200 ml Äthanol

Der Boc-His-OMe wird im Äthanol aufgenommen und mit 100 ml 1 N NaOH wie üblich verseift. Nach 45 Min wird die Lösung bei 0°C mit 1 N HCl neutralisiert und anschließend der Alkohol i.V. entfernt (25,5 g Boc-His-OH). Nach Zugabe von 23 g $NaHCO_3$ in 100 ml Wasser fügt man vorsichtig, über eine Periode von 1 Std., langsam das 2,4-Dinitrofluorbenzol in 150 ml MeOH hinzu. Das Reaktionsgemisch wird 10 Stdn. bei R.T. sich selbst überlassen. Anschließend wird das MeOH i.V. entfernt, die verbleibende wäßrige Phase nach 3-maligem Ausschütteln mit je 200 ml Diäthyläther, mit 1 N HCl bei 0°C auf pH 3,5 angesäuert und 3 mal mit je 200 ml Essigester extrahiert. Die vereinigten Auszüge werden mit Wasser gewaschen, über $MgSO_4$ getrocknet und i.V. eingedampft. Der ölige Rückstand wird 3 mal aus EtOH/PÄ umkristallisiert.

Ausbeute: 26,5 g (63 mMol) = 63% d.Th., $C_{17}H_{19}N_5O_8$ (421,38)

Fp.: 94,7°C (Lit.: 94°C) Ber.: C 48,44 H 4,54 N 16,62
Gef.: C 49,01 H 5,15 N 14,36

$(\alpha)_D^{20} = 46,2^\circ$ (Lit.: $(\alpha)_D^{20} = +55,3^\circ$) (c=1; Essigester)

2.5.9. Boc-Phe-OH (66)

In Abwandlung der allg. Vorschrift wurde hier die Suspension von Phe in Dioxan/Wasser vor der Zugabe der Natronlauge auf ca. 40°C erwärmt.
Die Kristallisation erfolgte aus Äther/Petroläther bei ca. 35°C. Dazu wird die Lösung am Rot.vap. ohne Vakkum rotiert (großer Rührfisch im Kolben). Die Badtemperatur beträgt 35°C. Nach 5 Min zeigt sich Trübung, die sich dann rasch verstärkt.

Ausbeute: 90% d.Th. $C_{14}H_{19}N\,O_4$ (265,3)

Fp.: 84–86°C (Lit. 84–86°C) Ber.: C 63,38 H 7,22 N 5,28
Gef.: C 63,37 H 7,20 N 5,20

$(\alpha)_D^{22} = -3,4°$ (Lit. -4,0°) (c = 1; AcOH)

2.5.10. Boc-Pro-OH (66)

Ausbeute: 96% d.Th. $C_{10}H_{17}N\,O_4$ (215,3)

Fp.: 134–136°C (Lit.136–137°C)

$(\alpha)_{578}^{22} = -43,4°$ (Lit. -44°) (c = 1; Dioxan)

2.5.11. Boc-Tyr(Bzl)-OH (74, 66)

Ausbeute: 33% d.Th. (über alle Stufen) $C_{21}H_{25}N\,O_5$ (371,4)

Fp.: 108–110°C (Lit.109–110°C) Ber.:C 67,74 H 6,99 N 3,76
Gef.:C 67,94 H 6,84 N 3,76

$(\alpha)_D^{22} = +3,6°$ (Lit. +5,5°) (c = 1; AcOH)

2.5.12. Boc-Val-OH (66)

Ausbeute: 85% d.Th. $C_{10}H_{19}N\,O_4$ (217,3)

Fp.: 75–76°C (Lit. 77–79°C) Ber.: C 55,22 H 8,74 N 6,44
Gef.: C 55,30 H 8,81 N 6,34

$(\alpha)_D^{22} = -8,0°$ (Lit. -5,8°) (c = 1; AcOH)

2.5.13. Boc-Asp(OBzl)-Arg($NO_2$)-Val-$OCH_3$

$C_{28}H_{43}N_7O_{10}$ (637,7) Ber.: C 52,74 H 6,80 N 15,38
Gef.: C 51,40 H 6,44 N 15,53

Diese Substanz wurde mir freundlicherweise von Herrn M.Caviezel (ETH Zürich) zur Verfügung gestellt.

## 3. Beschreibung der Versuche

### 3.1. Darstellung hochacetylierter Cellulose ( 75)

10 g Cellulosepulver werden in dest. Wasser gerührt. Nach 15 Min wird auf dem Büchnertrichter abgesaugt. Der feuchte Kuchen wird in einen Rundkolben überführt und mit 150 ml Eisessig versetzt. Nach wiederholtem Schütteln wird wieder abgesaugt. Dieser Entwässerungsvorgang wird noch 2 mal wiederholt. Die wäßrige Säure (Waschlösung) wird zur späteren Verwendung aufbewahrt. Die Cellulose wird bei R.T. in einen Kolben mit 150 ml Eisessig und 1 ml konz.Schwefelsäure gegeben. Die Mischung wird kräftig geschüttelt. Nach ca.1 Min werden 50 ml Acetanhydrid zugegeben. Die Reaktionsmischung wird kräftig geschüttelt. Temperaturanstieg auf ca.30-35°C. Nach 60 Min wird eine völlig klare, viskose Lösung erhalten. Um das überschüssige Acetanhydrid zu zerstören, wird unter Rühren mit Ultra-Turax eine Mischung aus 7,5 ml Wasser und 17,5 ml Eisessig zugegeben. Temperaturanstieg um ca.20°. Nach der Zerstörung des Acetanhydrid ist die Lösung noch ca.0,5-1,0%ig an Wasser. Dies reicht aus, um das Sulfat aus dem Celluloseester zu entfernen (96 ). Nach 30 Min wird die Lösung mit einem Teil der wäßrigen Essigsäure (Entwässerung zu Anfang) verdünnt. Das wird durch Eingießen in 3 l kräftig gerührtes Wasser gefällt. Danach wird mit Wasser gewaschen und durch nachwaschen mit Sodalösung stabilisiert. Zur Entfernung des Salzes wird dann nochmals mit Wasser gewaschen und dann bei 60° i.V. getrocknet.

### 3.2. Partielle Hydrolyse hochacetylierter Cellulose ( 76)

Diese kann im "Eintopfverfahren" direkt an die Acetylierung angeschlossen werden. Zu der Lösung des Celluloseacetats in Essigsäure wird eine Mischung aus 2,6 ml konz.

Salzsäure und 27 ml dest.Wasser tropfenweise unter starkem Rühren (Ultra-Turrax) hinzugefügt. Dies ergibt annähernd 20% Wasser in der Hydrolysenmischung und 0,1 M Salzsäure zusätzlich zur schon vorhandenen Schwefelsäure. Die Lösung wird 2 Tage bei 25°C stehengelassen. Das Produkt wird dann wie bei der Acetylierung gefällt, gewaschen und mit Soda stabilisiert.

### 3.3. Veresterung der C-terminalen Aminosäure mit dem Celluloseacetat.

#### 3.3.1. Aktivierung der Aminosäure mit DCC und HOBt (94)

| Ansatz: | | | |
|---|---|---|---|
| | I | 5 g 2,5-Celluloseacetat | (9,4 mMol freie OH-Gr.) |
| | II | Boc-Aminosäure | (100 mMol) |
| | III | DCC | ( 50 mMol) |
| | IV | HOBt | (100 mMol) |

I wird in 80 ml Pyridin gelöst. II und IV werden in 100 ml Methylenchlorid aufgenommen, die Mischung auf 0°C abgekühlt und III unter Rühren hinzugegeben. Nach 1 Std. bei 0°C und noch 1 Std. bei Raumtemperatur (rühren) wird vom ausgefallenen DC-Harnstoff abfiltriert. Das Filtrat wird am Rot. vap. zur Trockene eingedampft. Die weitere Bearbeitung verläuft wie unter 3.3.2. beschrieben.

#### 3.3.2. Aminosäure als symmetrisches Anhydrid aktiviert(95)

| Ansatz: | | | |
|---|---|---|---|
| | I | 5 g 2,5-Celluloseacetat | (9,4 mMol freie OH-G.) |
| | II | Boc-Aminosäure | (100 mMol) |
| | III | DCC | ( 50 mMol) |

II und III werden je in 40 ml Methylenchlorid gelöst, auf 0° abgekühlt, vereinigt und im Kühllabor bei 0-4° geschüttelt. Vom ausfallenden DC-Harnstoff wird abfiltriert. Das Filtrat wird am Rot.vap. bis zur Trockene eingeengt. Zu dem

festen Rückstand wird die Lösung von I in 70 ml Pyridin hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 72 Stdn. bei R.T. geschüttelt. Vom zusätzlich ausgefallenen DC-Harnstoff wird abfiltriert. Das Filtrat wird in Eis/MeOH-Mischung auf ca. -15° abgekühlt und tropfenweise, aber zügig, mit abs. Äther versetzt. Unter Rühren fällt das C.A.-Peptid aus. Zunächst wird möglichst viel Äther/Pyridin abdekantiert, danach in frischem Äther gerührt. Nach Abfiltrieren und Waschen mit Äther wird i.V. getrocknet.

### 3.4. Blockierung freier, nicht-veresterter Hydroxylgruppen

#### 3.4.1. Für acidolytisch empfindliche AS-Derivate

5 g C.A.-AS werden in 70 ml Methylenchlorid gelöst. 33 ml Acetanhydrid (0,35 Mol) und 49 ml Triäthylamin (0,35 Mol) werden zu dieser Lösung hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wird 4 Stdn. bei R.T. gerührt. Die Isolierung des Produktes erfolgt durch Fällen mit Äther oder Abziehen des Lösungsmittels i.V..

#### 3.4.2. Für acidolytisch unempfindliche AS-Derivate

5 g C.A.-AS werden 2 Stdn. bei 110° getrocknet und danach in einer Mischung aus 90 ml Eisessig und 10 ml Acetanhydrid gelöst. Unter high-speed-Rühren (Ultra-Turrax) wird eine Lösung von 0,2 ml 72% Perchlorsäure in 2 ml Eisessig zugegeben. Nach wenigen Minuten ist das Produkt bereits vollständig acetyliert. Das Produkt wird gefällt, gewaschen und stabilisiert, wie unter 3.1. beschrieben.

## 3.5. Abspaltung des Peptids vom Träger

### 3.5.1. Alkalische Verseifung der Esterbindung (96)

Das C.A.-Peptid (ca.0,1 mMol) wird in 20 ml 1,4-Dioxan/Äthanol (4:1) gelöst. Zu dieser Lösung werden unter Rühren sehr langsam 5 ml 1N KOH/Dioxan/EtOH (6:3:3) zugegeben. Nach vollendeter Zugabe wird noch 60 Min bei R.T. gerührt. Danach wird mit 1 N HCl neutralisiert. Die ausgefallene Cellulose wird durch Zentrifugation abgetrennt und mit Äthanol (oder anderem Lösungsmittel) gewaschen. Überstand und Waschlösung werden am Rot.vap. bis zur Trockene eingedampft.

### 3.5.2. Ammonolyse (83)

Das C.A.-Peptid (ca.1 mMol) wird in ca. 10 ml abs.Äthanol und 35 ml $CH_2Cl_2$ gelöst. Die Lösung wird bei -10°C mit Ammoniak gesättigt und 4 Tage bei R.T. stehen gelassen. Anschließend wird das Lösungsmittel unter Feuchtigkeitsabschluß abgedampft. Der Rückstand wird in einem Lösungsmittel, in dem sich das geschützte Peptid löst, gerührt. Die unlösliche Cellulose kann abzentrifugiert werden.

### 3.5.3. Versuche zur enzymatischen Hydrolyse des Celluloseacetat-Trägers

#### 3.5.3.1. Enzymatische Hydrolyse von 2,5-Celluloseacetat mit kommerzieller über Sephadex G-25 entsalzter oder gemäß 3.8. gereinigter T.v.-Cellulase.

Versuchsansatz:
20 mg 2,5-C.A. wurden mit 5 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,0 in ein L-förmig gebogenes Reagenzglas gegeben. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 mg Enzympräparat gestartet. Nach Versetzen der Reaktionsmischung mit Merthiolat oder Natriumazid ( 77 ) wurde das Reagenzglas bei 50°C in einem Wasserbad durch einen Motor so hin und her bewegt, daß das Reaktionsgemisch gut durchmischt blieb. Zu bestimmten Zeiten wurden Proben entnommen und mit DNS-Reagenz auf reduzierende Enden untersucht (2.4.14.).

#### 3.5.3.2. Enzymatische Hydrolyse von 2,5-Celluloseacetat mit einem Enzymgemisch aus T.v.-Cellulase und Citrus-Acetylesterase

Technische Durchführung wie bei 3.5.3.1.

Versuchsansatz:
100 mg 2,5-C.A. in 10 ml Lösung I von 3.9.1. + 25 mg T.v.-Cellulase + 20 mg Acetylesterase (3.9.). Die Reaktionsmischung wurde bei 30°C wie oben beschrieben geschüttelt. Die Reaktion wurde durch Messung des Natronlaugeverbrauchs am pH-Stat (2.4.10.) und durch die Bestimmung der reduzierenden Enden (2.4.14.) verfolgt.

3.5.3.3. Enzymatische Hydrolyse des 2,5-Celluloseacetats mit über Sephadex G-25 entsalzten Kulturfiltraten der Anreicherungskulturen von 3.10.2.2.

Versuchsansatz:
25 mg 2,5-C.A. in 2,5 ml 0,1 M Na-Acetatpuffer pH 5,0 (Puffer Nr.1, 2.2.2.) + 50 mg lyophilisiertes G-25-Kulturfiltrat

Technische Durchführung wie bei 3.5.3.1.

Die Inkubationstemperatur betrug 40°C. Der Reaktionsverlauf wurde durch die Bestimmung der reduzierenden Enden verfolgt (2.4.14.).

## 3.6. Abspaltung der Dnp-Schutzgruppe

Laut Literatur ( 73 ) sollte die Abspaltung in wäßriger carbonat-alkalischer Lösung (pH 8) mit überschüssigem 2-Mercapto-äthanol innerhalb einer Stunde bei R.T. erfolgen. Versuche mit Boc-His(Dnp)-OH ergaben jedoch, daß erst bei einem pH von 9,0 und einer Reaktionszeit von 24 Stdn. das Dnp völlig abgespalten war. Bei den Angiotensinpräparaten zeigte eine starke Gelbfärbung sowie die kleine Menge abgespaltenes Dnp (dünnschicht chromatographisch nachgewiesen), daß hier selbst unter diesen Bedingungen keineswegs quantitativ abgespalten war. Unter den Bedingungen, die für die Abspaltung des Peptids vom Träger (3.9.1.) verwendet wurden, konnte die relativ beste Abspaltung erzielt werden. Es wurde deshalb auf eine extra durchgeführte Dnp-Abspaltung verzichtet.

## 3.7. Abspaltung von AS-Schutzgruppen mit kondensiertem Fluorwasserstoff ( 79 )

Eine 30 ml Polypropylenflasche mit Schraubverschluß ist durch einen 1,5 mm starken Teflonschlauch mit einer HF-Bombe und durch einen weiteren Schlauch über ein $CaCl_2$-Rohr (PP) mit dem Abzug verbunden. Durch Kühlen in einer Kältemischung (Eis/MeOH) können in dieser Pulverflasche ca. 3 ml HF kondensiert werden. Um absolut wasserfreie Bedingungen zu haben, ist es sinnvoll etwas Kobalttrifluorid zuzugeben. In eine zweite Pulverflasche werden 65 mg teilgeschütztes Peptid, 0,15 ml Anisol und ein teflonbeschichteter Magnetrührfisch gegeben. Über einen weiteren Schlauch wird nun das Kondensat mit Hilfe von Stickstoff in das Reaktionsgefäß gedrückt. Es wird 1 Std. bei R.T. gerührt. Danach wird durch Anlegen eines

leichten Unterdrucks der Fluorwasserstoff abgedampft. Der verbleibende Rest wird im Vakuum über feuchtem Kaliumhydroxid (4 Stdn.) entfernt. Hierzu wird das verschlossene Reaktionsgefäß mit angeschlossenem CaCl-Rohr in einen Exsikkator gestellt und dieser evakuiert. Letzte Reste werden dann in einem anderen Exsikkator bei offenem Reaktionsgefäß im Hochvakuum entfernt.

## 3.8. Reinigung der käuflichen T.v.-Cellulase

1. Schritt: Rohextrakt

1 g rohes kommerzielles Enzym (lyophilisiertes Kulturfiltrat von T.v.) wird in 30 ml Wasser durch vorsichtiges Rühren (2 Std.; 4°C) extrahiert. Vom Ungelösten wird bei 10 000 x g (20 Min.) abzentrifugiert.

2. Schritt: Gelfiltration über Sephadex G-25

Der Rohextrakt wird über eine mit Sephadex G-25 gepackte Säule (2,4 x 70 cm) fraktioniert. Das Gel wird nach Herstellervorschrift vorbereitet und mit 0,01 M Phosphatpuffer (Nr. 2) pH 6,3 äqulibriert. Fraktionen von 5 ml werden gesammelt. Die Elutionsgeschwindigkeit beträgt 24 ml/Std.

3.Schritt: Gelfiltration über Sephadex G-75

Das Lyophilisat von Peak II (481 mg) wird in 4 ml Wasser gelöst und auf eine Säule (2,5 x 66 cm) mit Sephadex G-75 aufgetragen. Das Gel wird nach Herstellervorschrift vorbereitet und mit 0,01 M Phosphatpuffer (Nr.2) pH 6,3 äquilibriert. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 20 ml/Std.

4.Schritt: Pufferwechsel über Sephadex G-25

Die Fraktionen mit CM-Cellulase-Aktivität werden gesammelt, lyophilisiert, in 5 ml Wasser gelöst und zum Pufferwechsel über eine Sephadex G-25-Säule (1,7 x 14 cm) geschickt. Das Gel wird zuvor mit 0,01 M Succinatpuffer (Nr.3) pH 5,0 äquilibriert. Die Durchflußgeschwindigkeit beträgt 24 ml/Std. Die Fraktionen 1-12 werden gesammelt (60 ml). Nach Ausspülen der Reagenzgläser ergab sich ein Volumen von 80 ml.

5.Schritt: SP-Sephadex C-25 - Säulenchromatographie

Die gesammelten Fraktionen von Schritt 4 werden über eine SP-Sephadex C-25 - Säule (1,6 x 45 cm) geschickt. Der Austauscher wird nach der Herstellervorschrift behandelt und mit 0,01 M Succinatpuffer (Nr.3) pH 5,0 äquilibriert. Zunächst wird der vom Austauscher nicht festgehaltene Teil gesammelt (Peak I). Peak II wird durch Elution mit dem Succinatpuffer pH 7,0 (Nr.4) erhalten. Die gesammelten Fraktionen von Peak I und II werden lyophilisiert.

6.Schritt: Entsalzung über Sephadex G-25

Das Lyophilisat von Peak I wird zur Entsalzung in 2 ml Wasser gelöst und eine Sephadex G-25 - Säule (2,4 x 70 cm; Säule und Durchführung wie bei Schritt 1) geschickt und lyophilisiert.

## 3.9. Isolierung und Reinigung von Acetylesterase (EC 3.1.1.6.) aus Orangenschalen

### 3.9.1. Methode nach Jansen, Jang und Mc.Donnell ( 80 )

Lösung I: 24 g NaCl (0,41 Mol) + 15 g Na-Oxalat (0,11 Mol) werden in 0,9l dest. Wasser gelöst. Lösung wird auf einen Liter aufgefüllt und der pH auf 8,0 eingestellt.

3 kg Orangenschalen werden mit 6 l Lösung I im Mixer homogenisiert. Das Homogenat wird bei 3000 x g 30 Min. zentrifugiert. Man erhält 5,7 l "Preßsaft", der ohne Aktivitätsverlust über Nacht bei +4°C aufbewahrt werden kann.

Der sauer gewordene Preßsaft wird mit 1N NaOH auf pH 8,0 eingestellt und bis zur 0,4-Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt. Der erhaltene Niederschlag wird bei 3000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird bis zur 0,47-Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt und der entstehende Niederschlag ebenfalls abzentrifugiert. Das Präzipitat der 0,4-Sättigung wird in 150ml 0,1 M Na-Oxalatlösung aufgenommen. Es ergeben sich 190ml Suspension (FA). Ein Teil des $(NH_4)_2SO_4$-Niederschlags geht nicht in Lösung. Das Präzipitat der 0,47-Sättigung wird in 100ml 0,1 M Na-Oxalatlsg. aufgenommen und ergibt 200ml Suapension (FB). Auch hier bleibt ein Teil ungelöst.

FA wird vor der Dialyse halbiert, und zwar in einen relativ klaren Überstand (FA1), der beim Stehen der Suspension entstanden war und der Restmenge mit einem größeren Anteil an ungelöstem Präzipitat (FA2).
Dialysiert wird solange bis sich die 0,1 M Na-Oxalatlösung, gegen die dialysiert wird, nicht mehr durch austretendes Pigment gelb färbt. Es wird dann noch ca. 5 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert.

Die Dialysate werden bei 3000 x g 15 Min zentrifugiert. Die Sedimente werden mit dest. Wasser gewaschen, das gesammelte Waschwasser und die Überstände der Zentrifugation werden lyophilisiert.

### 3.9.2. Neue Methode zur Isolierung und Reinigung von Acetylesterase aus Orangenschalen

500 g von der Albedo befreite Orangenschalen werden in 100 g-Portionen mit je 200 ml Lösung I ( 3.9.1.) im Mixer homogenisiert und bei 3000 x g zentrifugiert. Die gesamte Menge an Sediment wird mit 500 ml Lösung I nachextrahiert. Die Extrakte (ca.1200ml) werden vereinigt und sofort mit 2 N NaOH neutralisiert. Danach werden sie über gut geschlämmtes Celite abgenutscht.

Das klare Filtrat wird über eine Säule mit 200 ml Dowex 1x2 geschickt und der Durchlauf aufgefangen(ca.1,2 l). Dieser Durchlauf wird mit Hilfe einer Hollow-Fiber-Dialysepatrone gegen dest. Wasser dialysiert und gegen einen leichten Unterdruck konzentriert. Dialyse und Konzentrierung wird einmal wiederholt. Diese Lösung wird dann lyophilisiert.

1,0 g Lyophilisat in 2 ml 0,01 M Ammoniumacetatpuffer (Nr. 9; 2.2.2.) pH 7,0 wird auf eine mit diesem Puffer äquilibrierte Sephadex G-75 - Säule (1,9 x 117 cm) aufgetragen und mit diesem Puffer eluiert. Im Eluat werden mit der Diazo-Fuchsin-Methode (2.4.6.2.) die aktiven Fraktionen bestimmt, 4 Stdn. gegen dest. Wasser dialysiert und schließlich lyophilisiert.

Das Lyophilisat wird in ca. 10 ml 0,05 M Ammoniumacetatpuffer pH 5,0(pro 100 mg) gelöst und auf eine mit dem gleichen Puffer äquilibrierte CM-Cellulose-Säule (1 x 20cm) aufgetragen. Nach Waschen mit ca. 50 ml Auftragpuffer wird mit je 20 ml Puffer vom pH 5,5, 6,0, 6,5 usw. bis 11,0 eluiert. Die Fraktionen werden neutralisiert, die aktiven gesammelt, gegen dest. $H_2O$ dialysiert und lyophilisiert.

### 3.9.3. Untersuchungen zur Substratspezifität der Citrus-Acetylesterase

24 g NaCl (0,41 M) + 15 g Na-Oxalat (0,11 M) werden mit dest. Wasser auf 1000 ml aufgefüllt. Der pH wird genau auf 6,5 eingestellt.

Ansatz: 20 ml Oxalatlösung + 10 mg Enzympräparat ( 3.9.2.) + Substrat (ca. 16 mMol Acetyl)

Eingesetzte Mengen der getesteten Substrate:

Triacetin 1,16 g, Pentaacetylglucose 1,25 g, Octacetylcellobiose 1,36 g, 2,5-Celluloseacetat 1,71 g

## 3.10. Pilzkulturen zur Gewinnung von extracellulären Enzymen, die sich für den Abbau von 2,5-Celluloseacetat eignen.

### 3.10.1. Submerskultur von Trichoderma viride

Das verwendete Grundnährmedium (81,86) enthält:

$NH_4NO_3$ (0,06%), $NaNO_3$ (0,38%), $KH_2PO_4$ (0,02%), $K_2HPO_4$ (0,015%), $NaH_2PO_4$ (0,2%), $Na_2HPO_4$ (0,15%), $MgSO_4 x\ 7H_2O$ (0,03%), Harnstoff (0,03%), Asparagin (0,05%), Pepton (0,02%) und distiller's solubles (0,02%).
Zusätzlich enthält das Medium noch folgende Salze in Spuren (mg/l):

$Ca(NO_3)_2 x\ 4H_2O$ (1,2mg), $FeSO_4 x\ 7H_2O$ (0,054mg), $H_3BO_3$ (0,06mg), $CuSO_4 x\ 5H_2O$ (0,2mg), $ZnSO_4 x\ 7H_2O$ (2,0mg), $MnCl_2 x\ 4H_2O$ (0,08mg), $CoCl_2 x\ 6H_2O$ (0,4mg) und $(NH_4)_6Mo_7O_{24} x\ 4H_2O$ (0,04mg).

Daraus wurden 3 verschiedene Nährmedien hergestellt:

Nr.1: Grundnährmedium + Cellulose (3%)
Nr.2: Grundnährmedium + Cellulose (1,5%) + 2,5-C.A. (1,5%)
Nr.3: Grundnährmedium + 2,5-C.A. (3%)

Von jedem Nährmedium wurden 50ml in 2 100ml-Erlenmeyer mit Kerbe gefüllt. Die Kolben wurden mit einem Wattebausch verschlossen und im Autoklaven bei 120° 30 Min. sterilisiert. Nach dem Abkühlen auf R.T. wurde nun jeder Kolben mit T.v. angeimpft und 9 Tage geschüttelt. Je ein Kolben pro Nährmedium wurde bei 27°C der andere bei 37°C gehalten.

Nach 9 Tagen wurden die Kulturmedien bei 20 000 x g zentrifugiert, mit $NaN_3$ (5 mMol/l) versetzt und auf Cellulaseaktivität (2.4.9.2.) getestet.

### 3.10.2. Kultur von unbekannten celluloseverwertenden Pilzen

#### 3.10.2.1. Anreicherungskultur durch selektive Wachstumsbedingungen

Zusammensetzung des Celluloseagar:

Grundnährmedium von 3.10.1. + Cellulose (3%) + Agar (1,5%)

Die noch flüssige, autoklavierte Agarnährlösung wird in sterile Plastikpetrischalen gegossen und auf R.T. abgekühlt.
Holz- und Rindenstückchen von verschiedenen verrottenden Baumstümpfen (Eiche und Fichte) wurden auf diesen Celluloseagar gelegt und bei 27°C und 37°C inkubiert. Zur Säuberung der Kulturen wurden aus den gewachsenen Mycelen runde Stücke ausgestanzt und damit frische Platten der gleichen Art beimpft.

Sämtliche Pilzkulturen, die ein gutes Wachstum zeigten, wurden dann auf Platten übertragen, die einen Celluloseagar enthielten, der dem Nährmedium Nr.2 von 3.10.1. entsprach.

Alle Pilze, die auch auf diesen Platten wuchsen, wurden dann auf Platten übertragen, die einen Celluloseagar enthielten, der dem Nährmedium Nr.3 von 3.10.1. entsprach, also statt Cellulose nur 2,5-Celluloseacetat enthielt.

#### 3.10.2.2. Submerskultur der angereicherten Pilze

Die Durchführung und die Bedingungen entsprachen genau denen von 3.10.1.

| Typ | Kolben-Nr. | Inkubat.Temp(°C) | Nährmedium |
|---|---|---|---|
| Eiche I | 1 | 27 | Nr. 1 |
| " | 2 | 37 | Nr. 1 |
| " | 3 | 27 | Nr. 2 |
| " | 4 | 37 | Nr. 2 |
| " | 5 | 27 | Nr. 3 |
| " | 6 | 37 | Nr. 3 |
| Fichte II | 7 | 27 | Nr. 1 |
| " | 8 | 37 | Nr. 1 |
| " | 9 | 27 | Nr. 2 |
| " | 10 | 37 | Nr. 2 |
| " | 11 | 27 | Nr. 3 |
| " | 12 | 37 | Nr. 3 |

Tab.

Nach 9 Tagen wurden die Kulturmedien bei 20 000 x g zentrifugiert, mit $NaN_3$ (5 mMol/l) versetzt und auf Cellulasenaktivität (2.4.9.2.) getestet.

Sämtliche Kulturfiltrate wurden lyophilisiert. Die Lyophilisate (600-800 mg) wurden in 4 ml Wasser gelöst und über eine Sephadex G-25 - Säule (2,4 x 45 cm) entsalzt.

Die Lyophilisate wurden mit dem Diazo-Fuchsin-Reagenz auf Esterasenaktivität (2.4.6.2.) getestet.

## 3.11. Synthese verschiedener Peptide

### 3.11.1. Synthese von Boc-Ile-Val-Gly-Ala-OH

A. Veresterung von Boc-Ala-OH mit 2,5-C.A.

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ansatz: I | 5,0 g | 2,5-Celluloseacetat | (9,4 mMol) |
| II | 18,9 g | Boc-Alanin | (100 mMol) |
| III | 10,0 g | DCC | ( 50 mMol) |

Die Durchführung erfolgte analog 3.3.2.
Ausbeute: 5,3 g

B. Synthesezyklus

Abspaltung der Boc-Gruppe:
1 g Boc-Ala-2,5-C.A. wurde in 10 ml abs. Dioxan gelöst. Zu dieser Lösung wurden 45 ml 4 N HCl/Dioxan gegeben. Nach 5 Min Schütteln wurde 20 Min unter Eiskühlung zusätzlich trockenes HCl-Gas eingeleitet. Das C.A.-Peptid fiel hierbei flockig aus. Vor dem Abfiltrieren wurde unter Rühren 1 Vol. abs. Äther zugegeben, zunächst abdekantiert und nochmals nach Zugabe von frischem Äther gerührt. Der Niederschlag wird auf diese Weise feiner und klebt beim Absaugen nicht zusammen. Nach dem Absaugen über eine Glasfritte (Jena G 3) wurde i.V. über Natriumhydroxid getrocknet. Ausbeute: 0,92 g

Peptidkupplung:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ansatz: I | 0,92 g | H-Ala-2,5-C.A. | (1 mMol) |
| II | 0,70 g | Boc-Glycin | (4 mMol) |
| III | 0,83 g | DCC | (4 mMol) |
| IV | 0,54 g | HOBt | (4 mMol) |

II und IV wurden in 4 ml Methylenchlorid gelöst und auf 0° abgekühlt. Zu dieser Lösung wurde eine ebenfalls vorgekühlte Lösung von III in 4 ml Methylenchlorid hinzugegeben. Die Reaktionsmischung wurde 1 Std. bei 0°, danach 1 Std. bei R.T. gerührt. Vom ausgefallenen DC-Harnstoff wurde

abfiltriert. Das Filtrat wurde am Rot.vap. vollständig eingeengt und in 10 ml Pyridin gelöst. Diese Lösung wurde mit der Lösung von I in 10 ml Pyridin vereinigt. Die Reaktionsmischung wurde 1 Std. bei 0-4°C, danach weitere drei Stdn. bei R.T. geschüttelt. Dem Reaktionsgemisch wurden Aliquots entnommen und durch Ninhydrintest auf quantitativen Umsatz getestet. Danach wurde vom zusätzlich ausgefallenen DC-Harnstoff abfiltriert, die Lösung auf ca. -15° abgekühlt und tropfenweise aber zügig, unter Rühren, mit trockenem Äther versetzt. Das Boc-Gly-Ala-2,5-C.A. fiel als lockeres, feines Pulver. Auf analoge Weise und in entsprechenden Ansätzen wurden anschließend auch Boc-Valin und Boc-Isoleucin angekuppelt. Endausbeute: 1,18 g

C. Abspaltung des Peptids

Das C.A.-Peptid wurde in 40 ml Dioxan gelöst. Zu dieser Lösung wurden zunächst 10 ml Wasser, danach 5,5 ml 1 N KOH/ Dioxan (1:1) gegeben. Bei R.T. wurde 1 Std. geschüttelt. und anschließend mit 1 N Salzsäure neutralisiert. Von der ausgefallenen Cellulose wurde abfiltriert und das Filtrat am Rot.vap. bis zur Trockene eingeengt.

D. Isolierung des Peptids

Die Isolierung des Rohproduktes erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie an Dowex 1 x 2

Auftragpuffer: 0,05 M Ammoniumacetat pH 7,9

Elution: Linearer Gradient aus Auftragpuffer uund 1 N Essigsäure

Die gesammelten Fraktionen wurden dünnschicht-chromatographisch untersucht (2.4.5.). Laufmittel Nr.1 und Nr.2. Die Totalhydrolyse wurde nach 2.4.1. durchgeführt. Die Hydrolysendauer betrug wegen der Ile-Val-Bindung 72 Stdn.

## 3.11.2. Synthese von Phe$^4$-Val$^5$-Angiotensin II

### 3.11.2.1. Synthese von des (Asp$^1$, Arg$^2$) Phe$^4$-Val$^5$-Angiotensin II

A. Veresterung von Boc-Phe-OH mit 2,5-Celluloseacetat

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ansatz: I | 5,0 g | 2,5-Celluloseacetat | (9,4 mMol) |
| II | 26,5 g | Boc-Phenylalanin | (100 mMol) |
| III | 20,6 g | Dicyclohexylcarbodiimid | (100 mMol) |
| IV | 13,5 g | 1-Hydroxybenzotriazol | (100 mMol) |

Die Durchführung erfolgte analog 3.3.1. Ausbeute: 6,26 g

B. Synthesezyklus

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe:
2 g Boc-Phe-2,5-C.A. werden in 20 ml abs. 1,4-Dioxan gelöst. Unter kräftigem Rühren wurden (Luftfeuchtigkeit vermeiden) in wenigen Portionen 90 ml 4 N HCl/Dioxan zugegeben. Die Lösung wurde 10 Min gerührt und währenddessen auf ca. 0° abgekühlt. Unter Rühren und Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff wurde noch 35 Min weitergerührt. Die entstandene Suspension wurde mit 1 Vol. abs.Diäthyläther versetzt und nochmals 5 Min gerührt. Vom schnell absitzenden Niederschlag wurde abdekantiert und unter Rühren mit frischem abs.Diäthyläther versetzt. Der Niederschlag wurde dann mit einer Glasfilternutsche abgesaugt und gründlich mit Diäthyläther gewaschen und i.V. über festem Kaliumhydroxid getrocknet.

Peptidkupplung:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ansatz: I | 1,88 g | H-Phe-2,5-Celluloseacetat | (2 mMol) |
| II | 1,72 g | Boc-Prolin | (8 mMol) |
| III | 1,65 g | Dicyclohexylcarbodiimid | (8 mMol) |
| IV | 1,08 g | 1-Hydroxybenzotriazol | (8 mMol) |

Die Voraktivierung der Aminosäure mit DCC und HOBt erfolgte

in abs.Tetrahydrofuran. Die Durchführung der Peptidkuplung entsprach im übrigen der von 3.5.
Ausbeute: 2,16 g

Auf analoge Weise und in gleichen Mengenverhältnissen wurden anschließend die übrigen Aminosäurederivate in der Reihenfolge Boc-His(Dnp)-OH, Boc-Val-OH, Boc-Phe-OH und nochmals Boc-Val-OH angekuppelt.

C. Abspaltung des Peptids

Von 100 mg C.A.-Peptid wurde nach 3.11.2.1. B der Boc-Rest abgespalten. Nach gründlichem Waschen mit abs.Äther wurde i.V. über Kaliumhydroxid getrocknet. Die Abspaltung des Peptids erfolgte nach 3.11.1. C . Dabei wurde gleichzeitig die Dnp-Schutzgruppe vom Histidin entfernt (3.6.).

D. Isolierung des Peptids

Die Isolierung des Rohproduktes erfolgte durch Ionenaustausch-Chromatographie an DEAE-Sephadex A-25.
Puffer: 0,05 M Ammoniumacetat pH 7,0
Mit dem Lyophilisat des Hauptpeaks wurde eine Totalhydrolyse (24 Stdn.; 2.4.1.) durchgeführt. Die Aminosäurezusammensetzung des Hydrolysats wurde mit einem Aminosäureanalysator untersucht.

### 3.11.2.2. Synthese von Phe$^4$-Val$^5$-Angiotensin II

Als Ausgangsprodukt für diese Synthese wurde das C.A.-Hexapeptid Boc-Val-Phe-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A., das Endprodukt der unter 4.5.2.1. beschriebenen Synthese, verwendet.

Abspaltung des Boc-Restes vom aminoendständigen Valin:
Das C.A.-Peptid (2,6 g) wurde in abs.1,4-Dioxan gelöst. Diese Lösung wurde 3 Tage bei R.T. stehengelassen. Bei der

Zugabe von Dioxan/HCl vermischte sich die sehr viskös gewordene Lösung nicht schnell genug mit dem Dioxan/HCl, sondern bildete Klumpen. Die Boc-Abspaltung wurde deshalb unterbrochen, Äther zugegeben und gründlich durch den Wechsel von Aufrühren in frischem Äther und Zentrifugation gewaschen. Über Nacht wurde i.V. über Natriumhydroxid getrocknet.
Die fein zerkleinerte Substanz wurde erneut in Dioxan aufgenommen und nach 24 Stdn. Rühren mit Dioxan/HCl versetzt. Hierbei ging zunächst ein beträchtlicher Teil der suspendierten Substanz in Lösung bzw. quoll sehr stark. Während dem Einleiten von trockenem Chlorwasserstoff fiel die Substanz wie gewöhnlich wieder aus und hatte auch rein äußerlich wieder die üblichen Eigenschaften.
Ausbeute: 1,43 g

An 400 mg dieser Substanz wurden nach dem Verfahren von 3.11.2.1. die Aminosäurenderivate Boc-Arg(Tos)-OH und Boc-Asp(OBzl)-OH angekuppelt. Durch die veränderten Löslichkeitseigenschaften des C.A.-Peptids konnten diese Kupplungen nicht in homogener Phase durchgeführt werden, sondern mußten mit einem teilweise nur gequollenen C.A.-Peptid bewerkstelligt werden.

Die Abspaltung des Peptids vom Träger sowie die Abspaltung der Dnp-Schutzgruppe vom Histidin erfolgte wie bei 3.11.2.1. Allerdings mußte auch hier in heterogener Phase gearbeitet werden.

Das abgespaltene teilgeschützte Peptid erwies sich als sehr gut wasserlöslich und konnte deshalb leicht durch Gelfiltration über Sephadex G-25 entsalzt werden:
(Säule: 2,0 x 110 cm; Sephadex G-25 fine; 0,05 M Ammoniumacetat-Puffer; Ausschlußvolumen: 132 ml (Dextranblau 2000); 40 ml/Std.)
Die Fraktionen wurden dünnschichtchromatographisch

untersucht (Kieselgel auf Alufolie; Laufmittel Nr.1; aufgetragen: 10 ul/Fraktion; 2,5 Stdn.). Alle paulypositiven Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert.

Nach gründlichem Trocknen (20 Stdn. bei 50° im Hochvakuum) wurde das Lyophilisat zur Abspaltung der restlichen Schutzgruppen mit kondensiertem Fluorwasserstoff (3.7.) behandelt.

Das Rohprodukt wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 50 isoliert (Säule: 2 x 14 cm; Auftragpuffer: 0,05 M Essigsäure/Äthanol (1:1); Elutionsmittel: 0,6 M Ammoniaklösung/Äthanol (1:1)).
Das Produkt der HF-Behandlung wurde in 15 ml Auftragpuffer gelöst und auf die Säule aufgetragen. Nach gründlichem Nachwaschen mit dem Auftragpuffer wurde mit $NH_3$/Äthanol eluiert. Die paulypos. Fraktionen wurden gesammelt und lyophilisiert.
Dieses Lyophilisat wurde ohne weitere Reinigung zur Aminosäureanalyse und zum biologischen Test verwendet.

### 3.11.3. Synthese von Ile$^5$-Angiotensin II

Der Verlauf und die Strategie können dem Syntheseschema (Abb.22) entnommen werden.

A. Veresterung von 2,5-Celluloseacetat mit Boc-Phe-OH

Ansatz und Durchführung entsprachen genau 3.11.2.1.A.

B. Synthesezyklus

Die Durchführung der Peptidkupplungen und der Boc-Abspaltungen entsprachen genau 3.11.2.1.
Ansätze für Kupplungen von Boc-Pro-OH und Boc-His(Dnp)-OH genau wie bei 3.11.2.1. B.

Ansätze für Kupplungen von Boc-Ile-OH und Boc-Tyr(Bzl)-OH wurden im Vergleich zu 3.11.2.1. B halbiert.

Ansatz für Kupplung von Boc-Asp(OBzl)-Arg($NO_2$)-Val-OH:

| | | |
|---|---|---|
| I | H-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. | 340 mg (0,21 mMol) |
| II | Boc-Asp(OBzl)-Arg($NO_2$)-Val-OH | 430 mg (0,86 mMol) |
| III | Dicyclohexylcarbodiimid | 177 mg (0,86 mMol) |
| IV | 1-Hydroxybenzotriazol | 116 mg (0,86 mMol) |

Im anschluß an die letzte Fällung wurde das C.A.-Octapeptid noch 4 x 4 Stdn. in abs.Äthanol gerührt, um evtl. noch vorhandenes Tripeptid zu entfernen (Kontrolle durch DC-Chromatogramm der Waschlösungen).

Das verwendete Tripeptid Boc-Asp(OBzl)-Arg($NO_2$)-Val-$OCH_3$ wurde auf klassischem Wege synthetisiert. Die Syntheseschritte waren, vereinfacht dargestellt:

a. Boc-Arg($NO_2$)-OH wurde mit DCC und HOBt aktiviert an H-Val-$OCH_3$ gekuppelt.
b. Boc-Asp(OBzl)-OH wurde mit DCC und HOBt aktiviert an H-Arg($NO_2$)-Val-$OCH_3$ gekuppelt.

Dieses Peptid wurde mir freundlicherweise von Herrn M. Caviezel (ETH-Zürich) zur Verfügung gestellt.

Verseifung des Methylesters von Boc-Asp(OBzl)-Arg($NO_2$)-Val-$OCH_3$:

750 mg geschütztes Tripeptid (1,21 mMol) wurden in 6 ml Äthanol gelöst. 250 ul 5N KOH wurden sehr langsam zugegeben. Nach vollendeter Zugabe wurde 1 Std. bei R.T. gerührt. Danach wurde mit 1 N Salzsäure und die Lösung i.V. (30° Badtemperatur) vom Äthanol befreit. Das zurückbleibende Öl wurde in ca. 5 ml $H_2O$ suspendiert und nach Ansäuern mit Essigsäure auf pH 3,0 mit Essigsäureäthylester 4 x extrahiert (beide Phasen wurden aufbewahrt). Die EE-Phase wurde danach 2 x mit gesättigter NaCl-Lösung

und Wasser gewaschen, über Magnesiumsulfat getrocknet und einrotiert. Das zurückbleibende Öl wurde wurde in Äthanol aufgenommen und mit Petroläther gefällt.
Ausbeute: 430 mg (0,86 mMol)

C. Isolierung des Peptids

Abspaltung des Peptids sowie der Dnp-Schutzgruppe:

100 mg geschütztes C.A.-Angiotensin (0,04 mMol) wurden in 20 ml 1,4-Dioxan/Äthanol (4:1) gelöst. Zu dieser Lösung wurden unter Rühren sehr langsam 5 ml 1 N KOH/Dioxan/EtOH (6:3:3) zugegeben. Sofort nach Zugabe von wenigen Tropfen färbte sich die gelbe Lösung durch das Dinitrophenol dunkel-orange. Schon nach kurzer Zeit zeigte sich dann eine Trübung, die im weiteren Verlauf immer stärker wurde. Nach vollendeter Zugabe wurde noch 60 Min bei R.T. weitergerührt. Danach wurde mit 1 N Salzsäure neutralisiert (Farbumschlag von orange nach gelb). Die ausgefallene Cellulose wurde durch Zentrifugation abgetrennt und mit Äthanol gewaschen. Überstand und Waschäthanol wurden am Rot.vap. bis zur Trockene einrotiert.

Entsalzung und Abtrennung der Dnp-Abspaltprodukte:

Der Rückstand (227 mg) wurde in 2 ml 0,05 M Ammoniumhydrogencarbonat gelöst. Diese Lösung wurde auf eine Sephadex G-10-Säule aufgetragen. (Säule: 1,9 x 107,5 cm; 0,05 M $NH_4HCO_3$; Ausschlußvolumen: 112 ml, Dextranblau 2000; Fraktion: 5 ml; 41 ml/Std.)

Abspaltung der restlichen Schutzgruppen:

Das Lyophilisat der Entsalzung des teilgeschützten Peptids (Peak II, Abb. 8) wurde im Hochvakuum bei 50°C 48 Stdn. getrocknet. Die Substanz (65,3 mg) wurde dann unter Feuchtigkeitsausschluß mit 0,15 ml Anisol und 3 ml kondensiertem Fluorwasserstoff (3.7.) versetzt und 1 Std. bei R.T. gerührt.

Danach wurde durch Anlegen eines leichten Unterdrucks der Fluorwasserstoff abgedampft. Der verbleibende Rest wurde über feuchtem KOH (4 Stdn.) entfernt. Hierzu wurde das Reaktionsgefäß mit angeschlossenem $CaCl_2$-Rohr in einen Exsikkator gestellt und dieser evakuiert.

Gelchromatographie über Sephadex G-10:

Der Rückstand der HF-Behandlung wurde mit 2 ml 0,05 M $NH_4HCO_3$ aus dem Reaktionsgefäß gelöst. Der pH dieser Lösung wurde mit 25% Ammoniak auf 8,0 eingestellt. Diese Lösung wurde auf die Säule aufgetragen: (Säule: 1,9 x 107,5 cm; 0,05 M $NH_4HCO_3$; Ausschlußvolumen: 112 ml, Dextranblau 2000; Fraktion: 5 ml; 40 ml/Std.)

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Peptidsynthese an Celluloseacetat

#### 4.1.1. Acetylierung von Cellulose (75)

Celluloseacetat wurde durch Reaktion von Cellulose-Pulver mit Acetanhydrid hergestellt. Eisessig wurde als Lösungsmittel und Schwefelsäure als Katalysator verwendet. Die Durchführung ist unter 3.1. beschrieben. Hierbei bildete sich kein Triacetat sondern ein Cellulose-acetat-sulfat Triester. Der Sulfatanteil in einem solchen Triester und nach milder Hydrolyse deshalb auch der Anteil an freien Hydroxylgruppen, hängt von der Menge der benutzten Schwefelsäure ab.

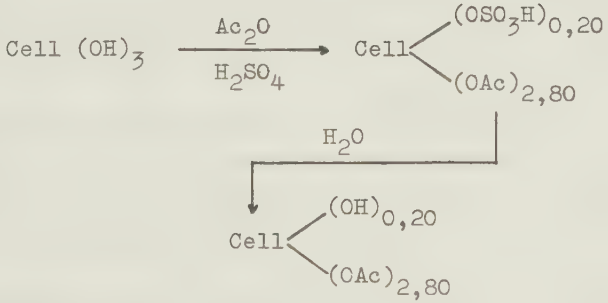


Abb. 4

Das Produkt enthielt ungefähr 42% Acetylgruppen, was einem DS von ca. 2,7 entsprach. Die freien Hydroxylgruppen bestehen in derartigen Produkten zu 75 - 80% aus primären Hydroxylgruppen (75).
Würde die Acetylierung ohne Katalysator durchgeführt, würde ein Produkt mit sehr geringem Anteil an primären Hydroxylgruppen erhalten. Um auf diese Weise auch die sekundären Hydroxylgruppen vollständig zu acetylieren, würden bei R.T. einige Wochen benötigt (82).

4.1.2. Einstellen des gewünschten Substitutionsgrades

Die partielle Hydrolyse hoch-acetylierter Cellulose zur Erreichung eines niedereren Substitutionsgrades konnte direkt, ohne Isolierung des Triesters, an die Acetylierung angeschlossen werden (3.2.).
Die Reaktionslösung wurde mit etwas mehr Wasser, als für die Zerstörung des Acetanhydrids und die Hydrolyse des Sulfatesters benötigt wird, versetzt und einige Zeit stehen gelassen.
Hierbei findet sowohl Hydrolyse als auch Rückveresterung statt. Welche Reaktion vorherrscht hängt von der Wassermenge in der Hydrolysemischung ab ( 76). Ein geringer Wassergehalt begünstigt die Rückveresterung und führt durch die leichtere Veresterbarkeit der primären Hydroxylgruppen zu Produkten mit geringem Gehalt an primären freien Hydroxylgruppen.
Bei einem Wassergehalt von 20% und einer Hydrolysedauer von 24 Stdn. wurde ein Produkt mit einem DS = 2,55 erhalten. 57% der freien Hydroxylgruppen sind primäre Hydroxylgruppen. Dies entsprach einem DS für die primären Hydroxylgruppen von ca. 0,28 ( 76).

Die Acetylierung von Cellulose mit Acetanhydrid ohne die Unterstützung eines Katalysators bevorzugt deutlicher als die katalysierte Reaktion die primären Hydroxylgruppen (40). Selbst nach längeren Reaktionszeiten sind ein größerer Teil der sekundären Hydroxylgruppen noch unverestert, während kaum noch unveresterte primäre Hydroxylgruppen vorhanden sind.
Dies ließ erwarten, daß wenn selbst der kleine Acetylrest die primären Hydroxylgruppen bevorzugt, die sterisch viel ungünstigeren Aminosäurederivate unter diesen Bedingungen, d.h. ohne Katalysator, ebenfalls die Reaktion mit den primären Hydroxylgruppen bevorzugen würden. Die Ergebnisse

der Beladungen von 2,5-C.A. mit Boc-Aminosäuren konnten diese Erwartung bestätigen. Selbst bei wochenlangen Reaktionszeiten konnte für diese AS-Derivate kein höherer DS als 0,3 gemessen werden.

Der Vergleich des selbst hergestellten partiell hydrolysierten Celluloseacetats (DS = 2,55) mit einer im Handel erhältlichen Substanz mit einem DS von 2,5 ergab annähernd gleiche Eigenschaften. Für die Peptidsynthesen konnte deshalb dieses Präparat benutzt werden.

### 4.1.3. Fixierung der C-terminalen Aminosäure

Zur Bildung der Esterbindung zwischen C-terminaler Aminosäure und 2,5-Celluloseacetat können im Prinzip alle bekannten Veresterungsmethoden angewandt werden.

Als wirsamste Metoden haben sich erwiesen:

1. Aktivierung der Aminosäure mit DCC und 1-Hydroxybenzotriazol (3.3.1.)
2. Aminosäure als symmetrisches Anhydrid aktiviert (3.3.2.).

Die Aminosäure wird im großen Überschuß (10 fach) eingesetzt, als Lösungsmittel wird Pyridin verwendet. Die Reaktionszeit beträgt ca. 3 Tage.

Bei diesen Verfahren werden sämtliche reaktive Hydroxylgruppen (primäre) verestert. Eine Wiederholung der Veresterung mit bereits verestertem 2,5-C.A. und neuen aktivierten Aminosäuren ergibt keine höhere Beladung. Auch die im Anschluß an eine Veresterung mit Boc-Phenylalanin durchgeführte Reaktion mit aktiviertem Boc-Alanin und Boc-Glycin (ohne Abspaltung der Boc-Gruppe vom veresterten Boc-Phenylalanin) ergibt keinen weiteren Einbau dieser sterisch günstigeren Aminosäuren.

Die Bestimmung der Beladung durch Aminosäureanalyse ergab je nach verwendetem Celluloseacetat Werte zwischen 0,9 und 1,1 mMol AS/g.

### 4.1.4. Blockierung nicht veresterter Hydroxylgruppen

Obwohl gezeigt werden konnte, daß beim Veresterungsverfahren nicht veresterte Gruppen auch bei einer Wiederholung der Veresterung nicht reagieren, können, um auch Nebenreaktionen während der Synthese (z.B. bei Veränderungen des Trägers) zu vermeiden, nach der Veresterung mit der C-terminalen Aminosäure die noch freien Hydroxylgruppen blockiert werden(3.4.).
Am besten wird diese Blockierung durch vollständige Acetylierung erreicht. Dabei kann analog zur Darstellung von Celluloseacetat gearbeitet werden. Anstelle von Schwefelsäure als Katalysator wird Perchlorsäure verwendet, da dieser Katalysator nicht wie die Schwefelsäure einen Ester mit den Cellulose-Hydroxylgruppen bildet und so eine vollständige Acetylierung erreicht wird.
Bei acidolytisch empfindlichen AS-Derivaten kann auch nach 3.4.2. gearbeitet werden.

### 4.1.5. Entfernung überschüssiger Reagenzien

Ein großer Vorteil der Methode nach Merrifield ist die problemlose Entfernung der überschüssigen Reagenzien durch einfache Filtration.
Durch die Möglichkeit das Celluloseacetat durch Zugabe von Wasser, Methanol, Äthanol oder Diäthyläther quasi-kristallin(keine Einschlüsse) aus einer Lösung auszufällen, läßt sich auch bei diesem Träger die Entfernung der Reagenzien

auf einfachste Weise durchführen. Die Reaktionsmischung in Pyridin, Methylenchlorid, Dioxan o.ä. wird dazu mit etwas Methylenchlorid verdünnt, auf ca.-10°C abgekühlt und unter Rühren langsam mit dem Fällungsmittel versetzt. Bei der Verwendung von Boc-Aminosäuren hat sich Diäthyläther hierfür am besten bewährt.

### 4.1.6. Abspaltung des Peptids vom Träger

Das Peptid kann auf einfache Weise durch schonende Verseifung der Esterbindung und durch Ammonolyse erfolgen. Eine weitere Möglichkeit könnte die Verwendung von Enzymen sein.

#### 4.1.6.1. Verseifung der Esterbindung

Bei dieser Methode wird das C.A.-Peptid in Dioxan gelöst und mit einer Mischung aus Dioxan und 1 N KOH (1:1) versetzt. Die Basenstärke beträgt 0,05 N. Statt KOH kann auch Ammoniak verwendet werden. Bei dieser Behandlung fällt reine unsubstituierte Cellulose aus. Sie kann leicht durch Filtrieren oder Zentrifugieren von der Peptidlösung getrennt werden (3.5.1.).

#### 4.1.6.2. Ammonolyse

Soll das synthetisierte Peptid eine C-terminale Amidgruppe besitzen, dann kann die Abspaltung durch Ammonolyse erfolgen (3.5.2.). Die Reaktionszeiten waren länger als bei der alkalischen Verseifung. Auf diese Weise gelang es die C-terminalen Aminosäuren Ala und Phe zu ca. 90% abzuspalten.

4.1.6.3. Versuche zur enzymatischen Hydrolyse des Celluloseacetat-Trägers

T.v.-Cellulasen sind in der Lage die unterschiedlichsten Cellulosederivate abzubauen (54,84).
Vorversuche ( 54 ) ergaben u.a., daß Cellulose, die mit Boc-Alanin (0,14 mMol/g) oder Alanin (0,1 mMol/g) verestert ist, von diesen Cellulasen abgebaut werden können. Es wurde nun getestet, ob sie auch 2,5-C.A. abbauen können. Die gemäß 3.9.3.1. durchgeführten Versuche ergaben ein negatives Ergebnis. 2,5-C.A. ist mit diesen Enzymen nich abbaubar.
Da dies mit größter Wahrscheinlichkeit auf den zu hohen Substitutionsgrad zurückzuführen ist ( 84), wurde der Versuch unternommen zusätzlich zu den Cellulasen ein Hilfsenzym zu verwenden, welches durch Abspaltung von Acetylgruppen den DS so weit erniedrigt, daß ein Cellulasen-Abbau möglich wird. Die Versuche, die hierzu mit der Citrus-Acetylesterase und Leberesterase gemäß den unter 3.5.3.2. beschriebenen Ansatz gemacht wurden, blieben jedoch ebenfalls erfolglos. Die Citrus-Acetylesterase war für diese Versuche verwendet worden, weil sie in Bezug auf pH- und Temperaturoptimum der T.v.-Cellulase sehr ähnlich ist ( 87 ).

Die Versuche mit Anreicherungskulturen celluloseacetatverwertender Pilze (3.10.2.; 3.5.3.3.) zeigten jedoch zumindest einen Teilerfolg. Im Gegensatz zu allen anderen Präp. zeigten bei diesen Versuchen lyophilisierte Kulturfiltrate aus Kolben 11 und 12 (Bezeichnung der Kolben siehe 3.10.2.2.) abbauende Wirkung auf 2,5-C.A.. Das Kulturfiltrat aus Kolben 11 konnte das eingesetzte 2,5-C.A. zu 1%, das Filtrat aus Kolben 12 sogar zu 5% abbauen.

## 4.2. Reinigung der käuflichen T.v.-Cellulase

Der Verlauf der Reinigung des lyophilisierten T.v.-Kulturfiltrats (Fa. Aldrich) ist aus der Tabelle (Tab. 5 ) ersichtlich. Die Durchführung wird unter 3.8. beschrieben.

Aus Gründen der Vorsicht (Verluste durch Schlauchzerstörung) wurde auf die Dialyse in normalen Dialyseschläuchen verzichtet und statt dessen Entsalzung oder Pufferwechsel über Sephadex G-25 durchgeführt. Von der Möglichkeit der Derivatisierung der Schlauchcellulose durch Acetylierung ( 85 ) wurde kein Gebrauch gemacht, da deren Einfluß auf die Porengröße nicht bekannt ist. Sephadex-Gel wird von den Cellulasen nicht angegriffen.

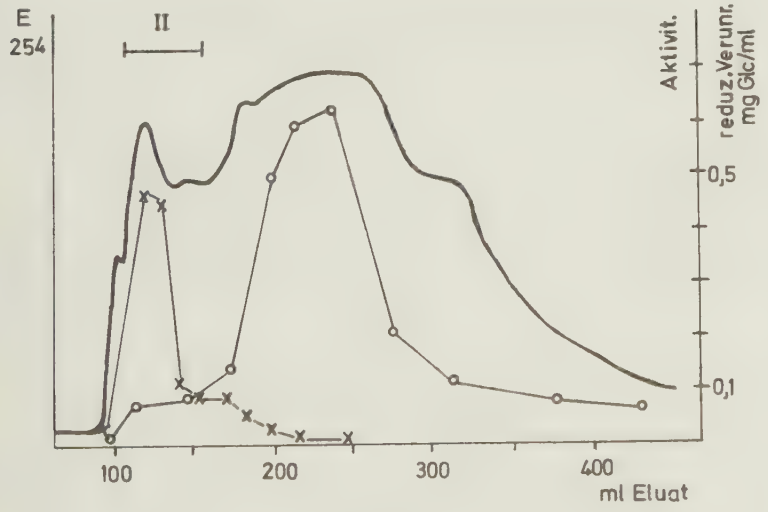


Abb. 5

Gelfiltration über Sephadex G-25 (Schritt 2)
Säule: 2,4 x 70 cm. Aufgetragen 15 ml Rohextrakt;
Fraktion 5 ml
——Absorption bei 254 nm; x——x CM-Cellulasenaktivität
o——o reduzierende Verunreinigungen

Tab. 5

| Schritt | | mg | ml | Prot. (mg) | Prot./ ml | U | U/mg Prot. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 Rohextr. | | 1000 | 30 | 33 | 0,3 | 49 | 1,49 |
| 2 G-25 | II | 481 | 50 | 24 | 0,48 | 41 | 1,71 |
| 3 G-75 | | 625 | 78 | 16 | 0,2 | 36 | 2,25 |
| 4 G-25 | | - | 80 | 13 | 0,16 | 32 | 2,46 |
| 5 C-25 | I | - | 124 | 5 | 0,04 | 19 | 3,8 |
| | II | - | 180 | 4 | 0,02 | 7 | 1,75 |
| 6 G-25 | I | 10 | 15 | 4 | 0,26 | 15 | 3,75 |

Durch den geringen Proteinanteil des Rohproduktes ist die Anreicherung auf U/mg Protein bezogen nur 2,5-fach. Die Anreicherung bezogen auf U/mg Substanz ist dagegen 30-fach.

Der Unterschied zwischen der Gesamtmenge und dem Proteingehalt des Endproduktes erklärt sich durch den hohen Kohlenhydratanteil dieser Glykoproteine ( 86 ).

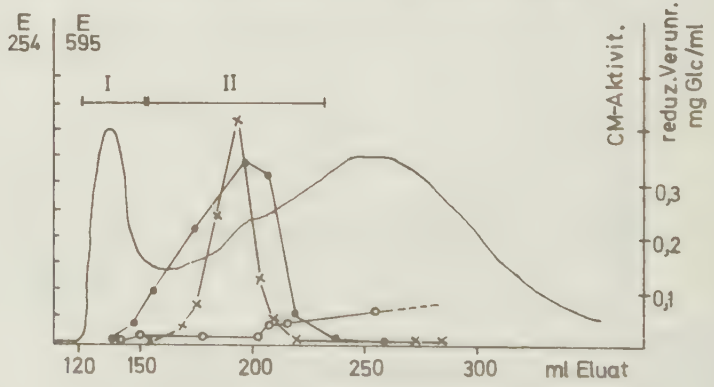


Abb. 6

Gelfiltration über Sephadex G-75 (Schritt 3)
Aufgetragen Peak II von Schritt 2.
—— Absorption bei 254 nm; x—x CM-Cellulasenaktivit.
o—o Proteasenaktivit.(Ext.595nm; 2.4.11.); o—o reduz.V.

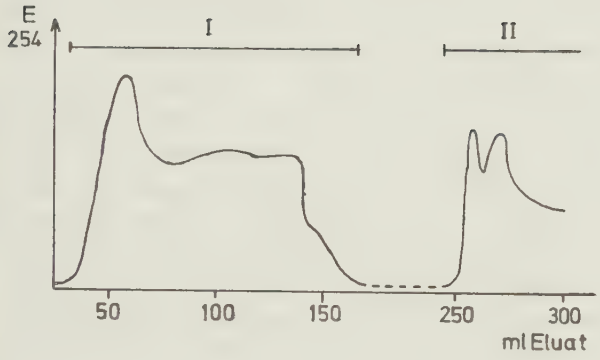


Abb. 7

SP-Sephadex C-25 - Säulenchromatographie (Schritt 5) Durchführung siehe unter 3.12. I enthielt die gesamte proteolytische Aktivität ($E_{595}$ = 0,68 bei 125 ng/ml) und fast die gesamte CMC-Aktivität (Tab.5).

Nach Selby & Maitland (86) sollte die in dem kommerziellen Enzympräparat enthaltene Protease durch den Schritt 5 entfernt werden. Bei dem verwendeten Präparat war dies nicht der Fall. Wahrscheinlich handelt es sich um 2 verschiedene Enzyme, deren Induktion von der Zusammensetzung des Kulturmediums abhängt.

Da die T.v.-Cellulasen, wie unter 4.1.6.3. berichtet, den in dieser Arbeit verwendeten Träger nicht abzubauen vermochten, wurde vorerst auf weitere Reinigungsschritte verzichtet.

## 4.3. Isolierung und Reinigung von Acetylesterase aus Orangenschalen (Acetylesterase = E.C. 3.1.1.6.)

Zur Präparation von Cirtus-Acetylesterase gab es bisher 2 verschiedene Methoden ( 87, 88). Beide gehen von einem Preßsaft der äußeren Schicht (Flavedo) der Citrusschale aus. Diesem Saft wird bis zur 0,7-Sättigung bzw. bis zur 0,4-Sättigung Ammoniumsulfat zugefügt. Die ältere Arbeit aus dem Jahr 1947 begnügt sich mit dieser Ammoniumsulfatfällung als letzten Reinigungsschritt. Die neuere Arbeit aus dem Jahr 1966 führt nach der Ammoniumsulfatfällung noch eine Acetonfällung an. Da diese Reinigungsverfahren nicht befriedigen konnten, wurde ein neues Verfahren entwickelt.
Um Informationen über die molekularen Eigenschaften des Enzyms, die bisher unbekannt waren, zu erhalten, wurde zunächst eine Präparation gemäß der Arbeit von Jansen et al. ( 87 ) durchgeführt.

### 4.3.1. Methode nach Jansen, Jang und Mc.Donnell ( 87 )

Die Durchführung ist unter 3.9.1. beschrieben. Der Verlauf der Reinigung kann aus der Tabelle (Tab.6 ) entnommen werden.

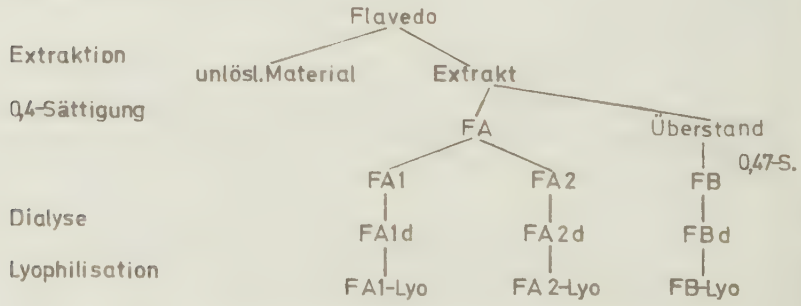


Abb. 8 Schematische Darstellung der Arbeitsschritte

| | Menge | Prot (mg) | Prot/ mg(ml) | U | U/ml (mg) | U/mgProt | Anr.bez. (U/Prot) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Extrakt | 5700 ml | 5985 | 1,05 | 5,13 | $9,0 \cdot 10^{-4}$ | $8,6 \cdot 10^{-4}$ | 1,0 |
| $(NH_4)_2SO_4$ | | | | | | | |
| FA | 190 ml | 532 | 2,8 | 2,43 | $1,3 \cdot 10^{-2}$ | $4,5 \cdot 10^{-3}$ | 5,3 |
| FB | 200 ml | 1900 | 9,5 | 1,72 | $8,6 \cdot 10^{-3}$ | $9,0 \cdot 10^{-4}$ | 1,1 |
| Überst. | 5700 ml | - | (0) | 0,72 | $1,2 \cdot 10^{-4}$ | - | - |
| Dialyse | | | | | | | |
| FA1d | 100 ml | - | - | 0,94 | $9,4 \cdot 10^{-3}$ | - | - |
| FA2d | 130 ml | - | - | 1,10 | $8,5 \cdot 10^{-3}$ | - | - |
| FBd | 300 ml | - | - | 1,44 | $4,8 \cdot 10^{-3}$ | - | - |
| Lyophil. | | | | | | | |
| FA1-Lyo | 614 mg | 289 | 0,47 | 0,74 | $1,2 \cdot 10^{-3}$ | $2,5 \cdot 10^{-3}$ | 2,9 |
| FA2-Lyo | 1275 mg | 459 | 0,36 | 0,92 | $0,7 \cdot 10^{-3}$ | $2,0 \cdot 10^{-3}$ | 2,3 |
| FB-Lyo | 2686 mg | 2068 | 0,77 | 0,62 | $0,2 \cdot 10^{-3}$ | $0,3 \cdot 10^{-3}$ | 0,3 |

Tab. 6

Bei der nach 2.4.15.1. durchgeführten Abschätzung des Molekulargewichts, durch Bestimmung des Verteilungskoeffizienten auf einer Sephadex G-75 - Säule wurde das Maximum der Acetylesterasen-Aktivität bei einem Elutionsvolumen von 138 ml gefunden. Daraus ergab sich für das Molekulargewicht ein Wert von 40 000 $\pm$ 5000 daltons.
Bei späteren MG-Abschätzungen mit Hilfe der selben Säule wurden auch weniger aktive Randfraktionen einer Gelfiltration über Sephadex G-75 aufgetragen. Hierbei wurden jeweils 2 Aktivitätsmaxima gefunden (Abb.12). Eines bei einem Elutionsvolumen von 129 ml das andere bei 175 ml. Dies würde Molekulargewichten von ca. 47 000 und 23 000 daltons entsprechen. Bezogen auf die Gesamtmenge an Enzym stellte dieser zweite Peak jedoch eine sehr geringe Menge dar.

Eine weitere MG-Bestimmung mit Hilfe einer mit Malatdehydrogenase und Cytochrom C geeichten Sephadex G-150-Säule (2.4.15.2.) ergab für das Enzym ein Elutionsvolumen von 63 ml, was einem Molekulargewicht von 35 000 ± 5000 daltons entspricht.

Da die Molekulargewichtsbestimmung durch Gelfiltration nur bei sphärischen Proteinen verläßliche Ergebnisse liefert, und über die Achsenverhältnisse der Citrus-Acetylesterase nichts bekannt ist, bedarf der gefundene Wert noch der Bestätigung durch andere Methoden. Als Anhaltspunkte für die Auswahl geeigneter Isolier- und Reinigungsmethoden können die Ergebnisse jedoch sehr gute Dienste leisten.

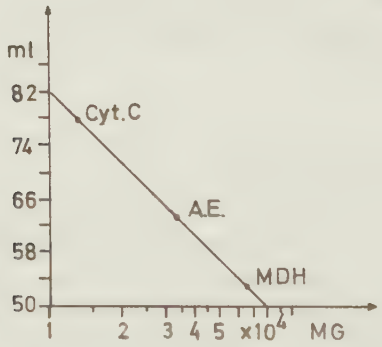


Abb.9 MG-Abschätzung durch Gelfiltration (2.4.15.2.)

Eine weitere für die Isolierung und Reinigung wichtige Moleküleigenschaft ist der Isoelektrische Punkt. Vortests mittels Papierelektrophoresen (2.4.6.1.) zeigten, daß es sich um ein basisches Protein handeln mußte. Die Abschätzung des IP durch Elektrophoresen auf C.A.-Streifen (2.4.16.1.) sowie durch Elektrofokussierung (2.4.16.2.) ergab einen Wert von 8,5 ± 0,5. (Abb.

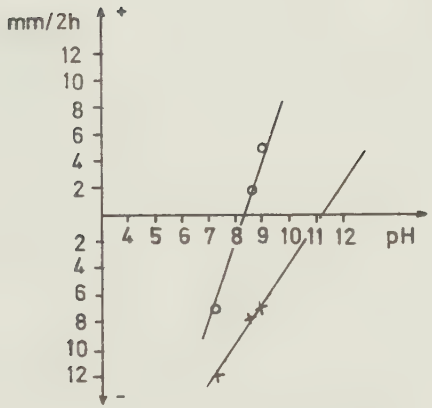


Abb. 10 IP-Abschätzung durch Elektrophoresen auf C.A.-Streifen, wie unter 2.4.16.1. beschrieben.

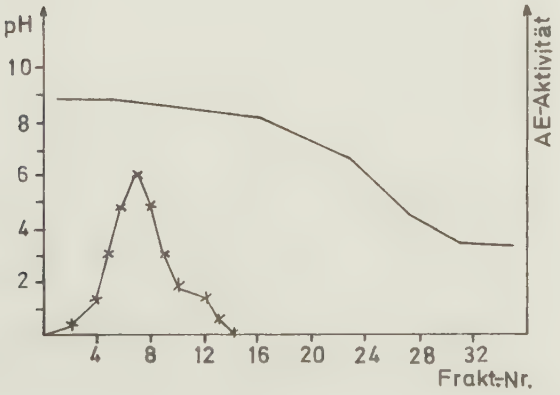


Abb. 11 IP-Bestimmung durch Elektrofokussierung, wie unter 2.4.16.2. beschrieben.
x——x AE-Aktivität, —— pH-Gradient

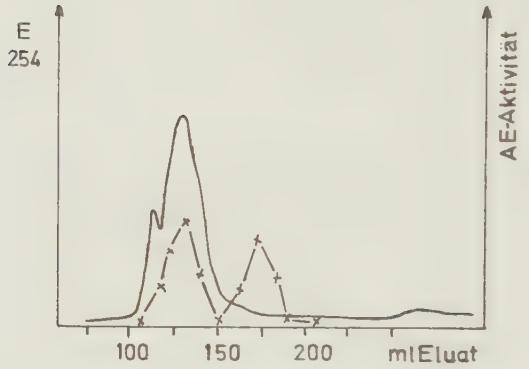


Abb. 12 MG-Abschätzung durch Gelfiltration über Sephadex G-75, wie unter 2.4.15.1. beschrieben. Bei diesem Versuch wurden weniger aktive Randfraktionen eines anderen G-75 - Laufes aufgetragen. x——x AE-Aktivität, —— Absorption 254 nm

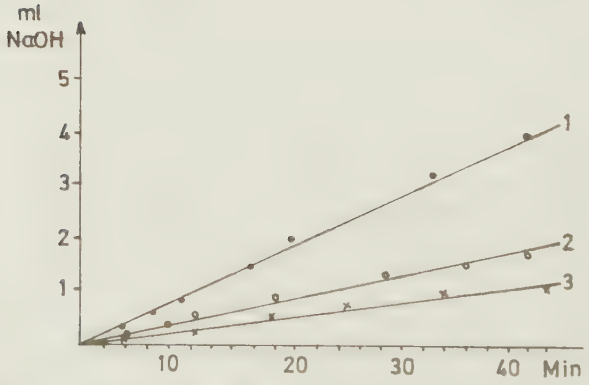


Abb. 13 Aktivität der Citrus-Acetylesterase gegenüber 1 = Glycerintriacetat, 2 = Pentaacetylglucose und 3 = Octaacetylcellobiose. Durchführung ist unter 3.9.3. beschrieben.

Bei der IP-Abschätzung auf C.A.-Streifen wurde ein weiteres Protein mit A.E.-Aktivität und einem IP vom ca. 11,1 gefunden. Ob es sich um ein Isoenzym oder einen Artefakt handelt,konnte noch nicht ermittelt werden. In diesem Zusammenhang ist das Ergebnis der M.G.-Abschätzung über Sephadex G-75 interessant, wo auch außer dem Hauptenzym noch ein weiteres mit einem Molekulargewicht von ca.23 000 daltons gefunden wurde. Es könnte sich also evtl. um eine Esterase mit kleinerem Molekulargewicht und einem IP von ca. 11 handeln (Abb. 12 u. 10).

4.3.2. Neue Methode zur Isolierung und Reinigung von A.E. aus Orangenschalen (Flavedo)

Der Verlauf kann aus dem Schema (Abb.14) sowie aus der Tabelle (Tab. 7 ) ersehen werden, die Durchführung ist unter 3.9.2. beschrieben.

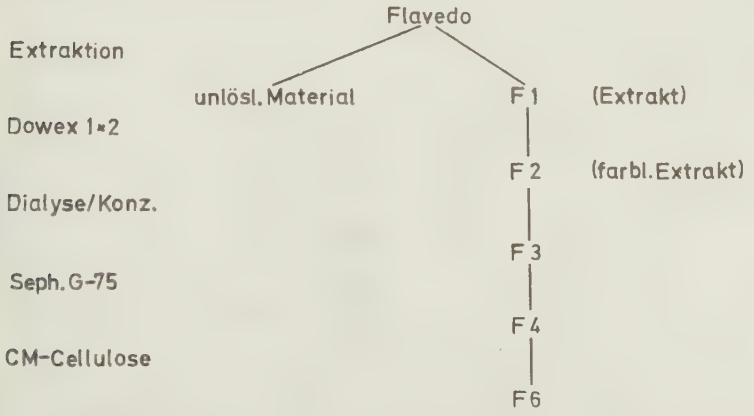


Abb. 14 Schematische Darstellung der Arbeitsschritte

| | Menge | Prot (mg) | Prot/ml (mg) | U | U/ml | U/Prot | Ausb. (%) | Anr. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| F 1 | 1200 ml | 1320 | 1,1 | 1,3 | $1,1 \cdot 10^{-3}$ | $9,8 \cdot 10^{-4}$ | 100 | 1 |
| F 2 | 1200 ml | 657 | 0,54 | 1,3 | $1,1 \cdot 10^{-3}$ | $2,0 \cdot 10^{-3}$ | 99,5 | 2 |
| F 3 | 2000 mg | 559 | 0,28 | 1,04 | - | $1,9 \cdot 10^{-3}$ | 80 | 1,9 |
| F 4 | 60 ml | 231 | 3,8 | 0,95 | $1,6 \cdot 10^{-2}$ | $4,1 \cdot 10^{-3}$ | 73 | 4,2 |
| F 6 | 151 mg | 112 | 0,74 | 0,86 | - | $7,7 \cdot 10^{-3}$ | 66 | 7,9 |

Tab. 7

Eines der schwierigsten Probleme der älteren Methoden, nämlich die Entfärbung des stark dunkel gefärbten Extrakts, wurde bei dieser Methode sehr einfach gelöst. Durch den sauren Charakter der Pigmente konnten diese mit Hilfe eines Anionenaustauschers (Dowex 1 x 2) fast quantitativ aus dem Extrakt entfernt werden. Hierbei ging keine Enzymaktivität verloren.

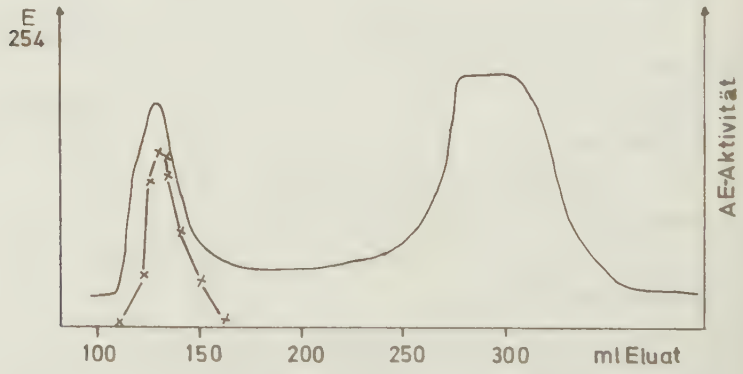


Abb. 15 Gelfiltration über Sephadex G-75 (F4), wie unter 3.9.2. beschrieben.
x——x AE-Aktivität, —— Absorption 254 nm

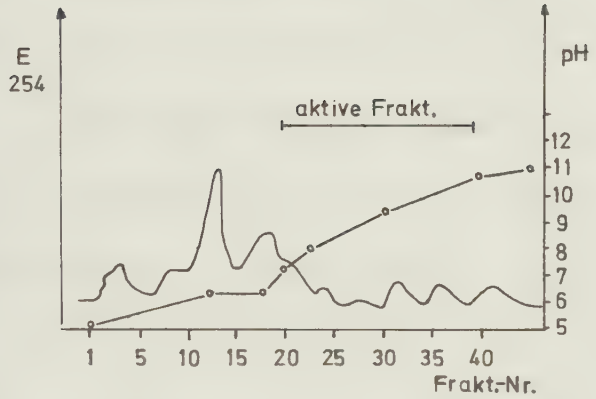


Abb. 16 Ionenaustausch-Chromatographie über CM-Cellulose (F6), wie unter 3.9.2. beschrieben. Fraktion 5 ml.
∘——∘ pH-Gradient, —— Absorption 254 nm

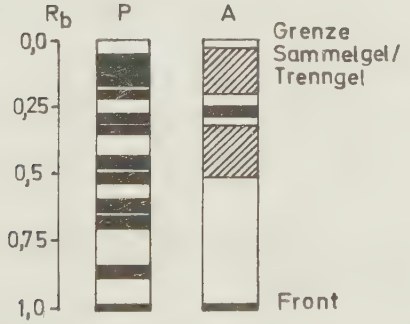


Abb. 17 Schematische Zeichnung einer analytischen Disk-Elektrophorese der Fraktion F6. Durchführung und Anfärbung sind unter 2.4.6.3. beschrieben.
P = Prot.anfärbung, A = Aktivitätsanfärbung
$R_b$ = Wanderungsstrecke Prot./W.str. Bromphenolblau

## 4.4. Pilzkulturen zur Gewinnung von extracellulären Enzymen, die sich für den Abbau von 2,5-Cellulose eignen.

### 4.4.1. Submerskultur von Trichoderma viride

Der Test auf Cellulaseaktivität der Kulturfiltrate ergab:

| Medium | Inkub.Temp.(°C) | Visk.abnahme(%) |
|---|---|---|
| C | 27 | 4 |
| C | 37 | 10 |
| C + CAc | 27 | 1 |
| C + CAc | 37 | 1 |
| CAc | 27 | 0 |
| CAc | 37 | 0 |

Dieser Test ergab eindeutig, daß der verwendete T.v.-Stamm das angebotene 2,5-C.A. nicht verwerten konnte. Aus diesem Grunde wurden anschließend Anreicherungskulturen mit unbekannten Pilzen durchgeführt.

### 4.4.2. Kultur von unbekannten celluloseverwertenden Pilzen

#### 4.4.2.1. Anreicherungskultur durch selektive Wachstumsbedingungen

Durchführung und Bedingungen wie unter 3.10.2.1. beschrieben.

Aus 5 verschiedenen auf Celluloseagar (Nährmedium Nr.1) wachsenden Kulturen wurden 2 selektioniert, die gutes Wachstum auch auf "Cellulose"agar (Nährmedium Nr.3) zeigten.

4.4.2.2. Submerskultur der angereicherten Pilze

Durchführung und Bedingungen wie unter 3.10.1. beschrieben.

Der Test auf Cellulase der Kulturfiltrate ergab:

| Typ | Kolben-Nr. | Inkub.Temp.(°C) | Visk.abnahme(%) |
|---|---|---|---|
| Eiche I | 1 | 27 | 21,7 |
| " I | 2 | 37 | 21,0 |
| " I | 3 | 27 | 22,8 |
| " I | 4 | 37 | 23,0 |
| " I | 5 | 27 | 13,0 |
| " I | 6 | 37 | 21,0 |
| Fichte II | 7 | 27 | 30,0 |
| " II | 8 | 37 | 31,7 |
| " II | 9 | 27 | 29,0 |
| " II | 10 | 37 | 32,5 |
| " II | 11 | 27 | 23,6 |
| " II | 12 | 37 | 28,0 |

Tab. 8

Es ergab sich daraus eindeutig, daß diese Pilze 2,5-Celluloseacetat als Substrat verwerten können.

Ein Esterasenschnelltest (2.4.6.2. ), der über Sephadex G-25 entsalzten Kulturfiltrate,ergab deutlich positive Reaktionen bei den Lyophilisaten der Kolben Nr.6, 10, 11 und 12.
Die übrigen Lyophilisate sowie das kommerzielle, über Sephadex G-25 gereinigte T.v.-Präparat der Fa.Aldrich zeigte keine positive Reaktion.

## 4.5. Synthesen verschiedener Peptide

### 4.5.1. Synthese des Modellpeptids Boc-Ile-Val-Gly-Ala-OH (Durchführung unter 3.11.1. beschrieben)

A. Veresterung von 2,5-C.A. mit Boc-Ala-OH

Die Veresterung erfolgte nach der symmetrischen Anhydrid-Methode (3.3.2.). Es wurden 5,3 g eines feinen, weißen Pulvers erhalten. Die Bestimmung der Beladung des Trägers mit Boc-Ala-OH wurde nach Abspaltung der Aminosäure sowie Abspaltung der Boc-Gruppe mittels Aminosäureanalyse durchgeführt. Es ergab sich eine Beladung von 1,11 mMol Ala/g. Dies bedeutet, daß 100% der primären und 61% sämtlicher freier Hydroxylgruppen des 2,5-Celluloseacetats reagiert haben.

B. Synthesezyclus

Die Abspaltung der Boc-Gruppen erfolgte durch Behandlung mit HCl/Dioxan. Bei diesem Verfahren fällt das Produkt wieder als feines, weißes Pulver an (3.11.1.). Die Peptidkupplungen erfolgten durch Aktivierung der Boc-Aminosäuren mit DCC und HOBt. Als Lösungsmittel wurde Pyridin verwendet. Die Aminosäuren wurden in 4-fachem Überschuß eingesetzt (3.11.1.).
Die Endausbeute betrug: 1,18 g Boc-Ile-Val-Gly-Ala-2,5-C.A.

C. Abspaltung des Peptids

Das C.A.-Peptid wurde mit einer Mischung aus Dioxan und 1 N KOH behandelt. Die Stärke der KOH betrug 0,05 N.

D. Isolierung des Peptids

Nach Abfiltrieren der Cellulose wurde das Peptid durch Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 1 x 2 isoliert. Der Hauptpeak zeigte dünnschicht-chromatographisch ein

einheitliches Verhalten.
Ausbeute: 254 mg (=71% d.Th. bezogen auf anfängliche Ala-Menge)

Nach einer Totalhydrolyse (72 Stdn.) ergab die Aminosäureanalyse folgende Zusammensetzung:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Ber.: | Ile 1 | Val 1 | Gly 1 | Ala 1 |
| Gef.: | Ile 0,97 | Val 1,05 | Gly 1,00 | Ala 1,07 |

### 4.5.2. Synthese von $Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II

#### 4.5.2.1. Synthese von des $(Asp^1, Arg^2)Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II

Der Verlauf und die Strategie dieser Synthese kann aus dem Syntheseschema (Abb.18) abgelesen werden. Die Durchführung ist unter 3.11.2.1. beschrieben.

A. Veresterung von 2,5-Celluloseacetat mit Boc-Phe-OH

Die Beladung mit Boc-Phe-OH verlief erwartungsgemäß und ergab ein sehr feines, weißes Pulver.
Ausbeute: 6,26 g Boc-Phe-2,5-C.A.
Beladung: Nach Aminosäureanalyse 0,93 mMol Phe/g (=90,4% der primären Hydroxylgruppen)

Obwohl die Beladung etwas niedriger als die mit Boc-Ala erreichte war, konnten selbst mit Boc-Ala und Boc-Gly keine weiteren Hydroxylgruppen dieses Trägers verestert werden (Reaktionszeiten dieser Versuche betrugen ca. 4 Tage die Aminosäuren wurden in 10-fachem Überschuß eingesetzt).

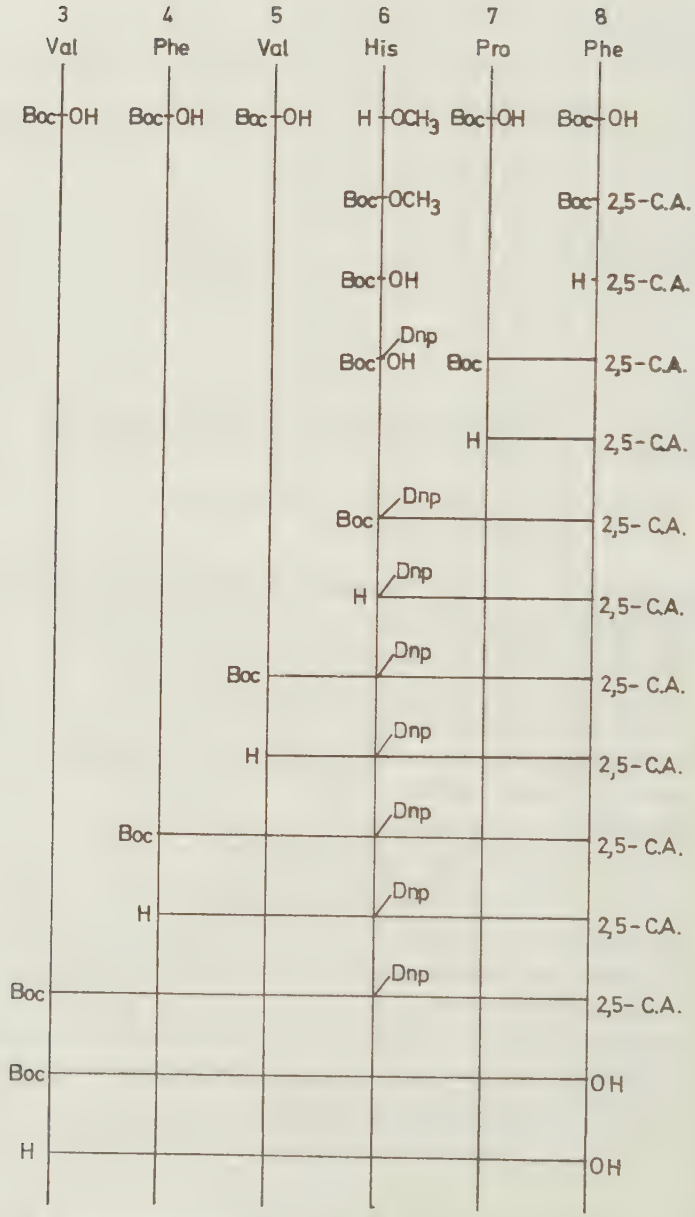


Abb.18 Syntheseschema des(Asp$^{1}$,Arg$^{2}$)Phe$^{4}$-Val$^{5}$-Angiotensin II

B. Synthesezyklus

Abspaltung der Boc-Schutzgruppe: Für die quantitative Abspaltung erwies sich bei der Verwendung von HCl/Dioxan als Abspaltreagenz eine zusätzliche Einleitung von trockenem Chlorwasserstoff in die Reaktionsmischung unerläßlich. Um das Zusammenkleben des C.A.-Peptids zu verhindern war es erforderlich nach beendeter Reaktion und vor dem Abfiltrieren 1Volumen abs. Äther zuzugeben.
(Ausbeute: 1,88 g H-Phe-2,5-Celluloseacetat)

Peptidkupplungen: Die Voraktivierung der Aminosäuren erfolgte mit Dicyclohexylcarbodiimid und Hydroxybenzotriazol (3.3.1.) in abs. Tetrahydrofuran. Die eigentlichen Kupplungen erfolgten wie bei 3.11.1. in Pyridin.

Die Ausbeuten an C.A.-Peptid betrugen im einzelnen:

a. Boc-Pro-Phe-2,5-C.A. = 2,16 g
b. Boc-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 2,70 g
c. Boc-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 2,73 g
d. Boc-Phe-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 2,72 g
e. Boc-Val-Phe-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 2,73 g

Die Beladung des Celluloseacetats mit geschütztem Hexapeptid betrug nach dem letzten Synthesezyklus insgesamt 1,54 mMol, bezogen auf 1,88 mMol Boc-Phe-OH in der ersten Stufe und 2,2 mMol primärer Hydroxylgruppen des ursprünglich eingesetzten 2,5-C.A.

Um bei den Fällungen (zwischen den Kupplungen) möglichst quantitative Ausbeuten zu erzielen, hat es sich bewährt die Mutterlauge auf 1/4 einzuengen und erneut mit Äther zu fällen. Aus Gründen der Rationalisierung des Verfahrens wurde auf diese Nachfällung in den meisten Fällen verzichtet.

50 mg des C.A.-Peptids wurden zur Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung entnommen und nach 3.11.1.C mit

KOH/Dioxan behandelt. Anschließend wurde mit 6 N HCl eine Totalhydrolyse (2.4.1.) durchgeführt.
Die Aminosäureanalyse ergab:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Ber.: | Pro 1 | Val 2 | Phe 2 | His 1 |
| | Pro 0,91 | Val 1,97 | Phe 2,0 | His 0,62 |

Der zu niedrige Wert für Histidin erklärt sich durch die unvollständige Abspaltung der Dnp-Schutzgruppe.

C. Isolierung des Peptids

50 mg des C.A.-Peptids wurden in 10 ml 1,4-Dioxan gelöst und nach 3.11.1.C mit 1 N KOH/Dioxan (1:1) behandelt. Nach dem Einrotieren bis zur Trockene wurde der größte Teil des abgespaltenen Dnp mit Essigester aus dem Rückstand extrahiert (dünnschicht-chromatographisch überprüft). Der gelbliche Rückstand wurde in wenig 0,05 M Ammoniumacetat (pH 7,0) gelöst und über eine DEAE-Sephadex A-25 - Säule gereinigt. Das Peptid passierte dabei ungehindert den Austauscher, während die Dnp-Abspaltprodukte (gelbe Farbe) und andere nicht näher charakterisierte Verunreinigungen festgehalten w rden. Diese konnten im leicht sauren bei höherer Ionenstärke eluiert werden (Abb.19).

(Säule: 1,5 x 25 cm; 30 ml/Std.; Fraktion 5 ml; Startpuffer: 0,05 M $NH_4Ac$; Gradient: 300 ml 0,05 M $NH_4Ac$ pH 7,0 und 300 ml 1,0 M $NH_4Ac$ pH 4,5)

Die paulypositiven Fraktionen (4-32) wurden gesammelt und lyophilisiert.

Das Lyophilisat wurde auf seine Aminosäurezusammensetzung untersucht.
Die Analyse ergab folgende Werte:

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| Ber.: | Pro 1 | Val 2 | Phe 2 | His 1 |
| Gef.: | Pro 1,00 | Val 2,00 | Phe 2,00 | His 0,62 |

Der zu niedrige Wert für das Histidin erklärt sich wieder durch die Abspaltungseigenschaften der Dnp-Schutzgruppe.

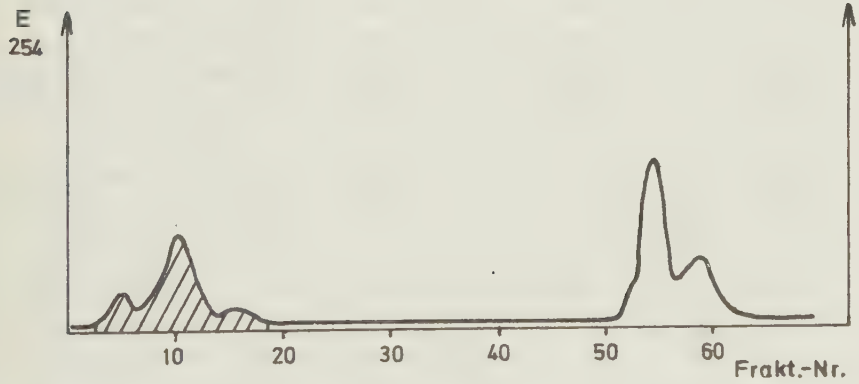


Abb. 19
Ionenaustauschchromatographie des Hexapeptids an DEAE-Sephadex A-25

### 4.5.2.2. Synthese von Phe$^4$-Val$^5$-Angiotensin II

Als Ausgangsmaterial für diese Synthese wurde das C.A.-Hexapeptid Boc-Val-Phe-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A., das Endprodukt der unter 4.5.2.1. beschriebenen Synthese, verwendet. Der Syntheseverlauf und die Strategie kann dem Schema (Abb. 20 ) entnommen werden. Die Durchführung ist unter 3.11.2.2. beschrieben.

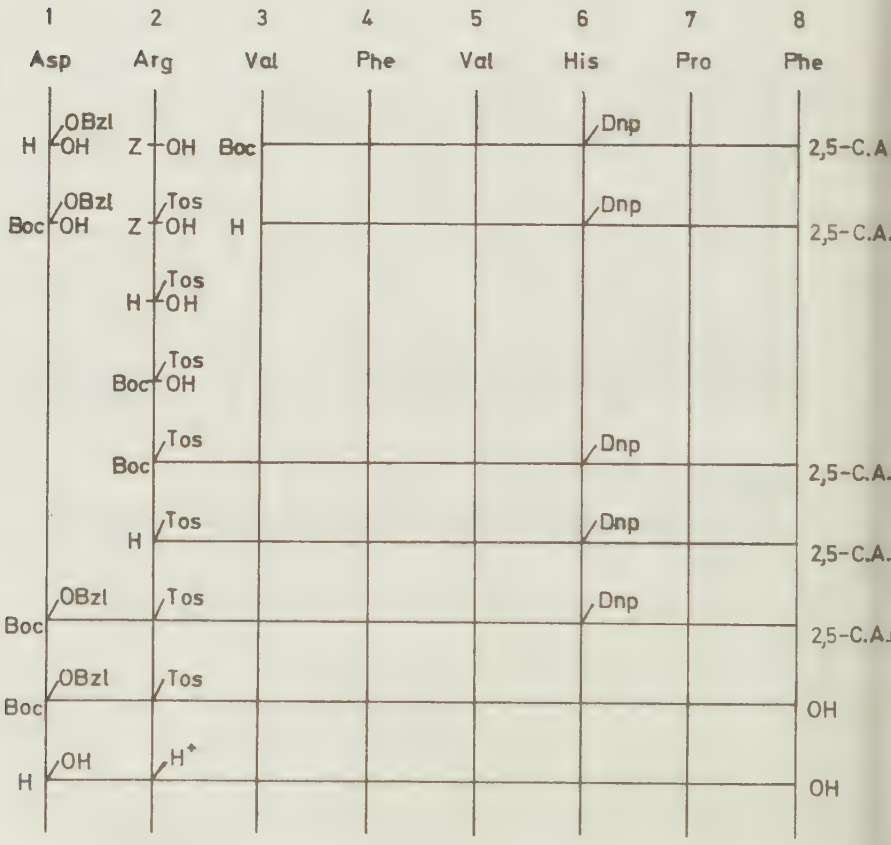


Abb.20 Syntheseschema Phe$^4$-Val$^5$-Angiotensin II

Bei der Abspaltung des Boc-Restes vom C.A.-Hexapeptid konnte die Lösung des C.A.-Peptids in 1,4-Dioxan nicht wie üblich sofort mit HCl/Dioxan versetzt und aufgearbeitet werden, sondern mußte auf Grund unglücklicher Umstände 3 Tage bei R.T. stehengelassen werden. Auf nicht geklärte Weise wurde der Träger hierdurch so verändert (evtl. Quervernetzung), daß er nicht mehr vollständig löslich war, sondern zu einem Teil nur noch stark quoll. Um die Auswirkungen auf die Reaktionseigenschaften zu erfahren wurde aber trotzdem mit diesem Produkt weitergearbeitet.
Bei der Boc-Abspaltung wurden 2,6 g C.A.-Hexapeptid eingesetzt. Als Ausbeute konnten auf Grund der Vorkommnisse nur noch 1,43 g H-Val-Phe-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. erhalten werden (55% d.Th.).

400 mg H-Val-Phe-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. (0,22 mMol) wurden analog 3.11.2.1. mit Boc-Arg(Tos)-OH und Boc-Asp(OBzl)-OH gekuppelt. Das teils gelöste, teils gequollene C.A.-Peptid wurde nach jeder der beiden Kupplungen auf die gleiche Weise mit Diäthyläther gefällt, wie sonst bei den löslichen Produkten.

Die Ausbeuten an C.A.-Peptid betrugen:

a. Boc-Arg(Tos)-Val-Phe-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 478 mg

b. Boc-Asp(OBzl)-Arg(Tos)-Val-Phe-Val-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 510 mg

Isolierung des Peptids

Die Abspaltung des Peptids vom Träger sowie die Abspaltung der Dnp-Schutzgruppe vom Histidin erfolgten gleichzeitig durch Behandlung des in Dioxan aufgenommenen C.A.-Peptids mit KOH/Dioxan (3.11.2.1.).
Vor der Abspaltung des Peptids vom Träger sollte die

Abspaltung der Dnp-Gruppe bei pH 8,0 mit Mercaptoäthanol ( 78 ) vorgenommen werden. Trotz genauem Vorgehen nach der Vorschrift konnte die Dnp-Gruppe weder vom C.A.-Peptid noch vom, als Kontrolle verwendeten Boc-His(Dnp)-OH, in ausreichendem Maße abgespalten werden. Diese Art der Dnp-Abspaltung hat sich in diesen Versuchen als völlig unbrauchbar erwiesen (siehe 3.6.). Besser, wenngleich auch nicht quantitativ, verlief die Abspaltung unter den Bedingungen der Peptid-Träger-Abspaltung bei pH 10,6 - 11 mit KOH/Dioxan.

Das abgespaltene teilgeschützte Peptid erwies sich als sehr gut wasserlöslich und konnte deshalb über eine Sephadex G-25 - Säule entsalzt werden.
(Säule: 2 x 110 cm; Sephadex G-25 fine; 0,05 M Ammoniumacetatpuffer)
Die Fraktionen wurden dünnschicht-chromatographisch untersucht. Alle paulypositiven Fraktionen wurden vereinigt und lyophilisiert. Ausbeute: 157,3 mg Lyophilisat (3 x lyoph.)

Die übrigen Schutzgruppen konnten mit kondensiertem Fluorwasserstoff (3.7.) abgespalten werden.

Das Rohprodukt wurde durch Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 50 isoliert (Abb. 21).

(Säule: 2 x 14 cm; Auftragpuffer: 0,05 M Essigsäure/Äthanol (1:1); Elutionsmittel: 0,6 M Ammoniaklösung/Äthanol (1:1); Fraktion 5 ml)

Gesammelt und lyophilisiert wurden:

I Frakt. 6 - 18 (paulynegativ)
II Frakt. 74 - 89 (paulypositiv)

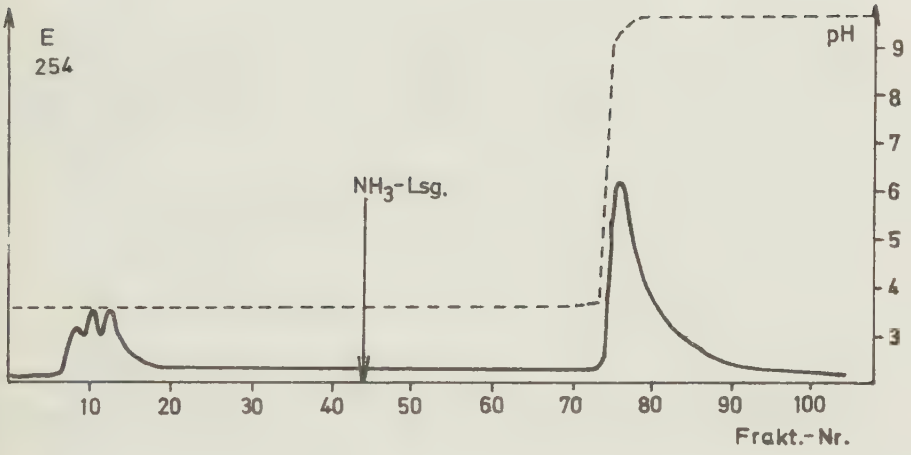


Abb.21 Ionenaustausch-Chromatographie an Dowex 50

Ohne weitere Reinigung wurden Aliquots des Lyophilisats der paulypositiven Fraktionen zur Aminosäureanalyse und zum biologischen Test verwendet.

Aminosäurezusammensetzung:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ber.: | Asp 1 | Arg 1 | Val 2 | Phe 2 | His 1 |
| Gef.: | Asp 0,89 | Arg 0,54 | Val 1,77 | Phe 2,0 | His 0,35 |

| | |
|---|---|
| Ber.: | Pro 1 |
| Gef.: | Pro 1,04 |

Biologische Aktivität:

Dieses Rohprodukt zeigte im Blutdrucktest an der anästhesierten Ratte (2.4.12.) blutdruckerhöhende Wirkung. Es ergaben sich 38 mU (Vasopressineinheiten)/mg.

## 4.5.3. Synthese von $Ile^5$ - Angiotensin II

Der Verlauf und die Strategie der Synthese kann dem Syntheseschema (Abb.22) entnommen werden. Die Durchführung ist unter 3.11.3. beschrieben.

A. Veresterung von 2,5-Celluloseacetat mit Boc-Phe-OH

Ansatz, Durchführung und Ergebnis entsprachen genau 3.11.2.1.A bzw. 4.5.2.1.

B. Synthesezyklus

Bis zur Anknüpfung von Boc-His(Dnp)-OH (einschließlich) wurde völlig analog zur Synthese von des ($Asp^1$, $Arg^2$) $Phe^4$-$Val^5$-Angiotensin II (3.11.2.1.B) verfahren.
Wie aus dem Syntheseschema (Abb.22) ersehen werden kann, folgten nun 2 andere Aminosäuren, nämlich Isoleucin und Tyrosin, die jedoch auf die gleiche Weise angekuppelt wurden. Nach der Kupplung von Boc-His(Dnp)-OH an H-Pro-Phe-2,5-C.A. wurde nur mit dem halben Ansatz weitergearbeitet. Die Ausbeuten an C.A.-Peptid betrugen bei den jeweiligen Kupplungen:

a. Boc-Pro-Phe-2,5-C.A. = 2,18 g
b. Boc-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 2,72 g
c. Boc-Ile-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 1,37 g (halber Ansatz)
d. Boc-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. = 1,51 g

Die Beladung des Celluloseacetats mit geschütztem Pentapeptid betrug nach dem letzten Synthesezyklus insgesamt 0,78 mMol, bezogen auf 0,94 mMol in der ersten Stufe und 1,1 mMol primärer Hydroxylgruppen des ursprünglich eingesetzten 2,5-Celluloseacetats.

Die 3 Aminosäuren $Asp^1$, $Arg^2$ und $Val^3$ wurden zunächst klassisch zu dem Tripeptid Boc-Asp(OBzl)-Arg($NO_2$)-Val-$OCH_3$ verknüpft. Nach der alkalischen Verseifung des Methylesters wurde dieses Tripeptid an das C.A.-Pentapeptid

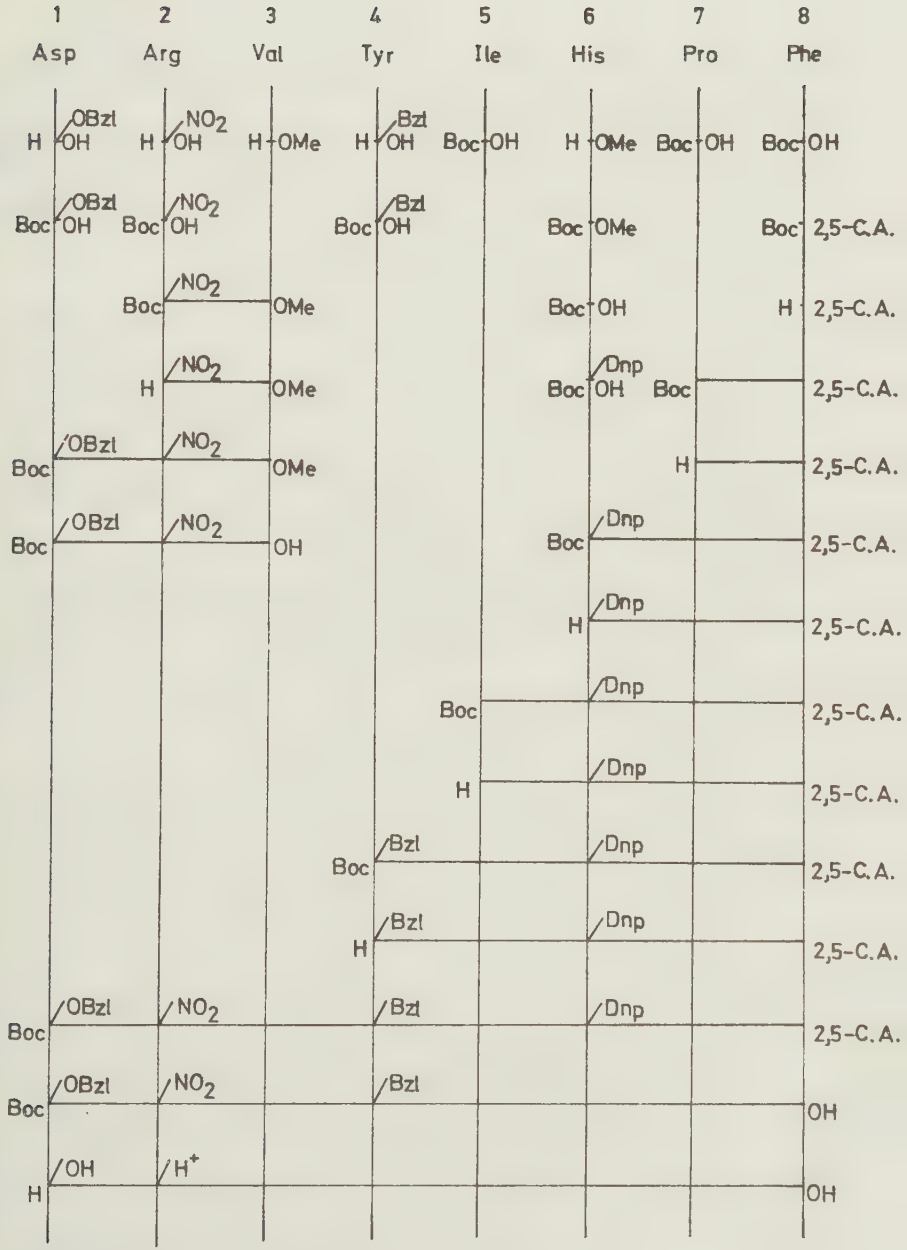


Abb. 22 Syntheseschema $Ile^5$ - Angiotensin II

H-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. durch Aktivierung mit DCC und HOBt angekuppelt.
Aus 340 mg H-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. (0,21 mMol) wurden auf diese Weise 432 mg Boc-Asp(OBzl)-Arg($NO_2$)-Val-Tyr(Bzl)-Ile-His(Dnp)-Pro-Phe-2,5-C.A. (C,17 mMol) erhalten.

C. Isolierung des Angiotensins

Abspaltung vom Träger und Abspaltung der Dnp-Schutzgruppe vom Histidin:
Das C.A.-Peptid wurde in Dioxan/Äthanol (4:1) gelöst und mit KOH/Dioxan/Äthanol behandelt. Die Cellulose fiel aus und konnte deshalb durch Zentrifugation abgetrennt werden. Die Mercaptolyse der Dnp-Gruppe hat sich, wie schon unter 4.5.2.2. berichtet, als unbrauchbar erwiesen.
Der Zentrifugationsüberstand wurde vollständig eingedampft, der verbleibende feste Rückstand in Ammoniumhydrogencarbonat-Lösung gelöst und über eine Sephadex G-10 - Säule entsalzt und von den Dnp-Abspaltprodukten gereinigt (Abb.23).

(Säule: 1,9 x 107,5 cm; 0,05 M $NH_4HCO_3$: Ausschlußvol.: 112 ml, Dextranblau 2000; Fraktion 5 ml; 40 ml/Std.)

Die dünnschicht-chromatographische Untersuchung der Fraktionen (20 ul/Fraktion auf Chromatogramm aufgetragen) ergab:
Fraktionen 16 - 60 einheitlicher, paulypositiver Fleck (Rf 0,56; Laufmittel Nr. 1)

Gesammelt und lyophilisiert wurden:

| | | | |
|---|---|---|---|
| Peak I | Fraktion | 16 - 19 | 3,0 mg Lyophilisat (2 x lyoph.) |
| Peak II | Fraktion | 20 - 70 | 70,5 mg Lyophilisat (2 x lyoph.) |

Die gelbe Bande der Dnp-Abspaltprodukte wurde erst nach ca. 10-fachem Bettvolumen (1,4 l) der Säule eluiert.

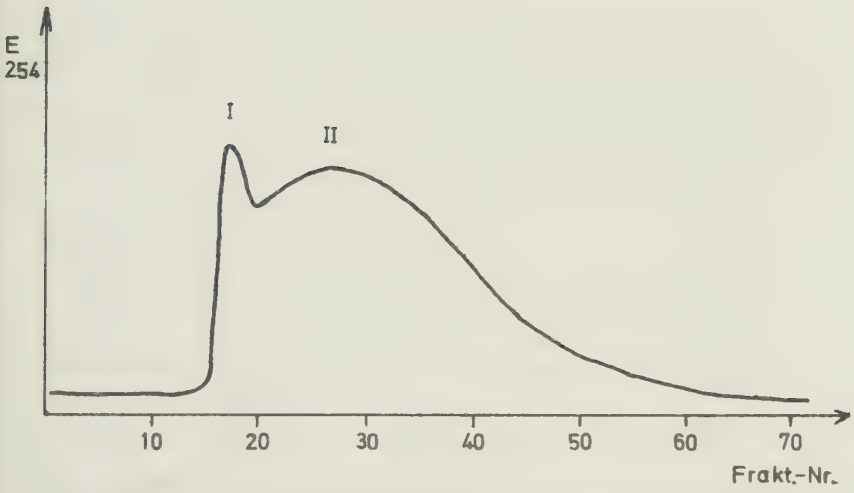


Abb. 23 Gelchromatographie des teilgeschützten $Ile^5$- Angiotensins II über Sephadex G-10

Aliquots von Peak I und II (Abb.23) wurden der Totalhydrolyse unterworfen. Die Hydrolysate wurden dünnschichtchromatographisch untersucht (Abb.24). Es ergab sich, daß beide fast identisch waren. Peak I schien lediglich mit Spuren undefinierter Aminosäuren verunreinigt zu sein. Wegen seines geringen Anteils an der Gesamtmenge wurde es deshalb verworfen.

Zur Abspaltung der restlichen Schutzgruppen wurde das Lyophilisat von Peak II mit kondensiertem Fluorwasserstoff behandelt.
Das Rohprodukt der HF-Behandlung wurde durch Gelfiltration über Sephadex G-10 gereinigt (Abb.25). Puffer und Säule waren mit denen der Reinigung des teilgeschützten Peptids (Abb.23) identisch.

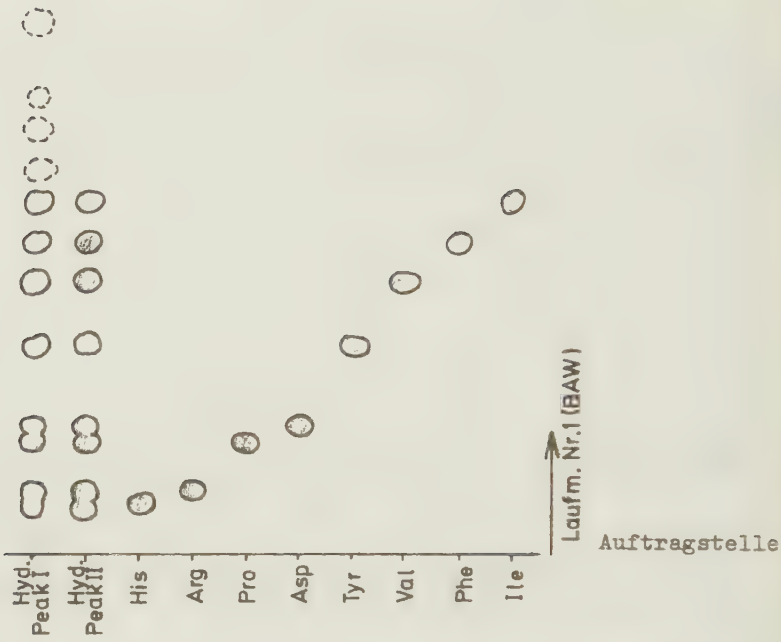


Abb. 24 DC-Chromatogramm der Hydrolysate des teilgeschützten Ile -Angiotensins, Laufzeit: 5 Stdn., DC-SiF-Platten, Entwicklung: Ninhydrin, Pauly und Sakaguchi

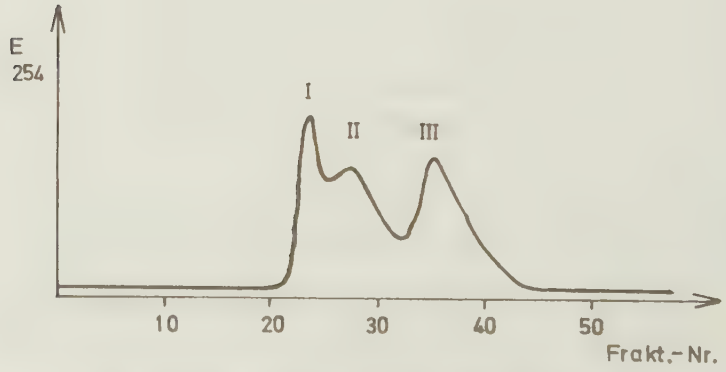


Abb. 25 Gelchromatographie des ungeschützten $Ile^5$-Angiotensins über Sephadex G-10

Aliquots der Peaks I,II und II (Abb.25) wurden der Totalhydrolyse unterworfen. Die Hydrolysate wurden wieder wie oben dünnschicht-chromatographisch untersucht. In den Hydrolysaten aller 3 Peaks konnten die geforderten Aminosäuren nachgewiesen werden. Das Chromatogramm des Hydrolysats des Peaks II zeigte die deutlichste Auftrennung der einzelnen Flecken. Dieser Peak wurde deshalb zur Aminosäureanalyse und zum biologischen Test benutzt.

Die Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung ergab:

| | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| Ber.: | Asp 1 | Arg 1 | Val 1 | Tyr 1 | Ile 1 |
| Gef.: | Asp 1,01 | Arg 1,00 | Val 0,98 | Tyr 0,95 | Ile 0,98 |
| Ber.: | His 1 | Pro 1 | Phe 1 | | |
| Gef.: | His 0,81 | Pro 1,26 | Phe 1,00 | | |

Die Substanz zeigte im Blutdrucktest an der anästhesierten Ratte (2.4.12.) blutdruckerhöhende Wirkung (Abb.26). Es ergaben sich 110 mU (Vasopressineinheiten)/mg.

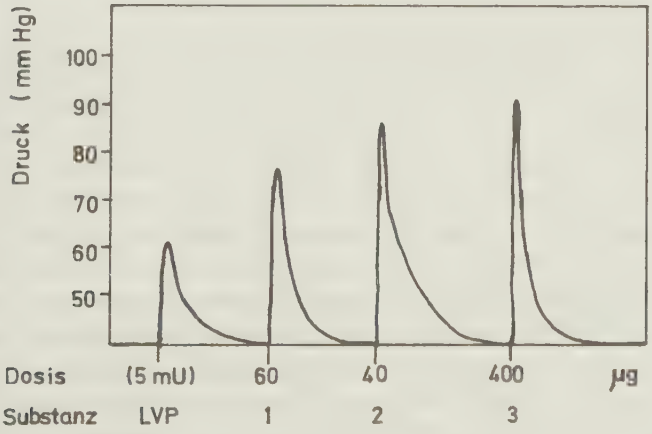


Abb. 26 Angiotensin-Test (2.4.12.). Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt des Schreiberprotokolls. LVP = Lysin-Vasopressin, 1 = Ile$^5$-Angiotensin, 2 = Val$^5$-Angiotensin, 3 = Phe$^4$-Val$^5$-Angiotensin.

## 5. Diskussion

Die trägergebundene Peptidsynthese hat gegenüber dem klassischen Verfahren den Vorteil der Einfachheit und der Schnelligkeit. Große Probleme verursachen, z.B. beim Verfahren nach Merrifield ( 8 ) das Kuppeln in heterogener Phase sowie die Abspaltung des synthetisierten Peptids. Es wurden Träger entwickelt ( 33 ), die während der Peptidkup lung löslich sind und deshalb günstigere Voraussetzungen für quantitaive und störungsfreie Kupplungen bieten. Die Abspaltung des fertigen Peptids ist jedoch auch bei diesen Trägern immer noch problematisch. In dieser Arbeit wurde deshalb der Versuch unternommen einen möglichst enzymatisch abbaubaren Träger zu entwickeln. Nach beendeter Peptidsynthese ließe sich so durch enzymatische Zerstörung des Trägers das fertige Peptid unbeschadet vom Träger trennen. Selbstverständlich sollte der verwendete Träger auch eine gute Tauglichkeit für die eigentliche Peptidsynthese besitzen.

5.1. Vorversuche ( 54 ) hatten gezeigt, daß Cellulose auch dann noch enzymatisch abbaubar ist, wenn sie teilweise substituiert vorliegt. Die Wahl der polymeren Grundsubstanz fiel deshalb auf die Cellulose. Unter den verschiedenen Cellulosederivaten zeigte sich das Celluloseacetat (DS = 2,5) auf Grund seiner chemischen und physikalischen Eigenschaften, als Träger für die Peptidsynthese, besonders geeignet. Sein Substitutionsgrad und somit seine Eigenschaften ließen sich leicht und kontrollierbar verändern. Die C-terminale Aminosäure des Peptids ließ sich ohne Probleme, z.B. über DCC-Aktivierung an den Träger binden. Da der Träger sowie das C.A.-Peptid in Methylenchlorid, Pyridin, Chloroform und Dioxan löslich waren, konnten die Peptidkupplungen in Lösung durchgeführt werden. Das gebildete C.A.-Peptid ließ sich danach sehr leicht durch Äther quasi-kristallin fällen und

ermöglichte dadurch die einfache Abtrennung der überschüssigen Reagenzien durch Filtrieren und Waschen. Die Ablösung der C-terminalen Aminosäure vom Träger konnte durch schonende alkalische Hydrolyse bzw. durch Ammonolyse der Esterbindung erfolgen.

5.2. Die enzymatische Hydrolyse des Celluloseacetats(DS = 2,5) war mit angereicherten kommerziellen Cellulasen nicht möglich. Der Substitutionsgrad dieses Cellulosederivats erwies sich für diese Enzyme als zu hoch.

5.3. Die Hoffnung, den Substitutionsgrad durch teilweise enzymatische Abspaltung der Acetylgruppen soweit zu erniedrigen, daß die Cellulasen den so veränderten Träger doch abbauen könnten, hat sich nicht bestätigt. Vorversuche mit kommerzieller unspezifischer Leberesterase verliefen völlig negativ. Auch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche mit einer eigens zu diesem Zweck isolierten und angereicherten Acetyl-Esterase aus Orangenschalen verliefen ohne Erfolg. Da dieses Enzym laut Literatur ( 87 ) in pH- und Temperaturoptimum große Ähnlichkeit mit den Cellulasen hat, bestand die Hoffnung, durch ein Zusammenwirken in einer "Eintopfreaktion" doch ein positives Ergebnis zu erzielen.

5.4. Da die Produktion mikrobieller Enzyme oft durch eine im Nährmedium anwesende Substanz induziert werden kann, wurde nach diesen negativen Ergebnissen der Versuch unternommen, aus unbekannten, celluloseverwertenden Pilzen solche abzutrennen, die auch Celluloseacetat verwerten können. Aus den Kulturfiltraten von Submerskulturen solcher durch Anreicherungskulturen gewonnener Pilze konnten Lyophilisate gewonnen werden, mit welchen Celluloseacetat teilweise abgebaut werden konnte. Im günstigsten Fall konnte das Celluloseacetat bis zu 5% abgebaut werden.

Dieses Ergebnis ließ sich selbstverständlich noch nicht in der Praxis der Peptidchemie verwerten, berechtigt jedoch zu der Hoffnung, daß auf diesem Wege, evtl. auch mit Hilfe von Mutanten, Exoenzyme gewonnen werden können, die das Celluloseacetat spezifisch und vollständig abbauen können. Einschränkend muß noch bemerkt werden: Wenn die Pilze in der Submerskultur das angebotene Celluloseacetat ohne Schwierigkeiten verwerten können, der Abbau mit den Enzymen des Kulturfiltrats im zellfreien System jedoch bei 5% stoppt, kann dies bedeuten, daß die direkte Anwesenheit der Pilzzellen bei der Substratverwertung eine wichtige Rolle spielt(94). Da aber andererseits die Abwesenheit von Proteasen und Peptidasen eine wichtige Bedingung für die Anwendung in der Peptidsynthese darstellt, bedeutet die Anwesenheit der Pilze durch die eventuelle Produktion von Proteasen eine Gefahr für das synthetisierte Peptid. Es ist nämlich fraglich ob durch den Einsatz von Proteaseninhibitoren der Abbau des soeben synthetisierten Peptids verhindert werden könnte.
In dieser Arbeit sollte eine rein enzymatische Lösung dieses Problems versucht werden. Durch die leichtere Hydrolysierbarkeit der Acetylgruppen wäre jedoch auch ein Verfahren denkbar, welches chemische und enzymatische Methoden kombiniert. Es könnten z.B. durch eine sehr milde alkalische Hydrolyse zunächst nur der größte Teil der Acetylgruppen abspalten werden. Danach wäre dann der enzymatische Abbau des Trägers durch Cellulasen wesentlich erleichtert.

5.5. Über die unter 5.3. bereits erwähnte Citrus-Acetylesterase (E.C. 3.1.1.6.) waren bisher in der Literatur (87 - 93) nur sehr wenige Angaben über molekulare Eigenschaften und nur ein sehr unbefriedigendes Anreicherungsverfahren beschrieben. In dieser Arbeit wurde deshalb ein verbessertes Anreicherungsverfahren entwickelt. Zu diesem Zwecke wurde zuvor das mittels des alten Verfahrens

gewonnene Enzym näher charakterisiert. Das Molekulargewicht wurde auf 35000 ± 5000 daltons der isoelektrische Punkt auf 8,5 ± 0,5 geschätzt.

## 6. Zusammenfassung

6.1. In dieser Arbeit wurde Celluloseacetat (DS = 2,5) als Träger für die Peptidsynthese entwickelt. Mit diesem Träger konnte während der eigentlichen Peptidkupplung in homogener Phase gearbeitet werden. Zur Entfernung überschüssiger Reagenzien konnte er dann sehr leicht wieder ausgefällt, filtriert und gewaschen werden. Bei Beladungen um 1 mMol Peptid/g Träger ließ sich dieser Träger mit in der Peptidsynthese üblichen Lösungsmitteln und Synthesemethoden verwenden.

6.2. Die gelungene Synthese eines Tetrapeptids sowie zweier Angiotensin II - Analoga mit biologischer Aktivität stellten seine Tauglichkeit unter Beweis.

6.3. Der enzymatische Abbau dieses Trägers wurde versucht. Mit kommerziellen Cellulasen wurde kein Abbau erzielt, da der Substitutionsgrad dieses Cellulosederivats zu hoch ist. Eine Erniedrigung des Substitutionsgrads durch die Einwirkung einer Esterase, vor der eigentlichen Hydrolyse durch die Cellulasen, blieb ohne Erfolg. Dagegen konnte mit Hilfe von Exoenzymen aus Pilzkulturen ein bis zu 5%iger Abbau von Celluloseacetat erzielt werden.

6.4. Kommerzielle Cellulase (E.C. 3.2.1.4. u. E.C. 3.2.1.21.) wurde durch Gel- und Ionenaustausch-Chromatographie gereinigt.

6.5. Aus Orangenschalen wurde Acetylesterase (E.C. 3.1.1.6.) isoliert und angereichert. Um ein brauchbares Präparat zu erhalten wurde ein neues Anreicherungsverfahren entwickelt. Als Vorarbeiten hierzu wurden MG- und IP-Abschätzungen durchgeführt sowie ein neues Verfahren zur Aktivitätsanfärbung auf Filter- oder Elektrophoresepapier mittels Methylrot erarbeitet.

6.6. Zur Erzeugung von C.A.-abbauenden Enzymen wurden Anreicherungskulturen mit unbekannten Pilzen durchgeführt. Die C.A.-verwertenden Organismen wurden in Submerskultur kultiviert. Mit einem der daraus gewonnenen Kulturfiltrate konnte 2,5-Celluloseacetat teilweise (5%) abgebaut werden.

## 7. Literaturverzeichnis


1. DuVigneaud,V. et al. (1953), J.Amer.Chem.Soc. 75, 4879-4880
2. Boissonnas, R.A. u. Guttmann,S.,Berde,B. u. Konzett,H. (1961), Experientia 17, 377-390
3. Hörnle,S., Weber,U. u. Weitzel,G. (1968), Z.Physiol.Chem. 349, 1428-1430
4. Weitzel,G., Weber,U.,Hörnle,S. u. Schneider,F.(1968), In "Peptides 1968" (E.Bricas,ed.), pp 222-227, North-Holland Publ., Amsterdam
5. Weitzel,G., Weber,U., Hörnle,S. u. Schneider,F.(1968), In "Peptides 1968" (E.Bricas,ed.), pp 222-227, North-Holland Publ., Amsterdam
6. Weitzel,G., Eisele,K.,Zollner,H. u. Weber,U. (1970), Z.Physiol.Chem. 350, 1480-1483
7. Weitzel,G., Weber,U., Eisele,K., Zollner,H. u. Martin,J. (1970), Z.Physiol.Chem. 351, 263-267
8. Merrifield,R.B. (1963), J.Amer.Chem.Soc. 85, 2149-2154
9. Merrifield,R.B. (1964), J.Amer.Chem.Soc. 86, 304-305
10. Marshall,G.R. u. Merrifield,R.B. (1965), Biochemistry 4, 2394-2401
11. Manning,M.(1968), J.Amer.Chem.Soc. 90, 1348-1349
12. Meienhofer,J. u. Sano,Y. (1968), J.Amer.Chem.Soc. 90, 2996-2997
13. Bayer,E.,Eckstein,H.,Hägele,K.,König,W.,Brüning,W., Hagenmaier,H. u. Parr,W. (1970), J.Amer.Chem.Soc. 92, 1735-1738
14. Shapira,R.,Chou,F.C.H.,Chawla,R.K.,Kibler,R.F. (1971), J.Amer.Chem.Soc. 93, 267-268
15. Yaron,A. u. Schlossmann, S.F. (1968) Biochemistry 7, 2673-2681

16. Merrifield,R.B. u. Marglin,A. (1967),
In "Peptides" (H.C. Beyerman,A. van de Linde und Maassen,W. van den Brink, eds.) pp. 85-90,
North-Holland Publ., Amsterdam

17. Jorgensen, E.C.,Windridge,G.C. u. Lee,T.C. (1970),
J.Med.Chem. 13, 352-356

18. Windridge,G.C. u. Jorgensen,E.C. (1971),
Intra-Science Chem. Reports 5, 375

19. Brenner,M. (1967),
In "Peptides 1967", Proceedings of the 8th European Peptide Symposium, Nordwijk, pp 1-7,
North-Holland Publ., Amsterdam

20. Frankhauser,P., Schilling,B. u. Brenner,M. (1972),
In "Peptides 1972", Proceedings of the 12th European Peptide Symposium, Reinhardsbrunn Castle,East Germany,
North-Holland Publ., Amsterdam

21. Weygand,F., Wünsch, E., Unveröffentlicht, zitiert in Wünsch,E. (1971), Angew.Chem. 83, 773-782

22. Mitchell,A.R. u. Roeske, R.W. (1970),
J.Org.Chem. 35, 1171-1172

23. Brunfeldt,K. et al. (1972), Chemistry and Biology of Peptides (Meienhofer, ed.) Proceedings of the 3rd American Peptide Symposium, Boston, 1972, p. 183
Ann Arbor Sci., Ann Arbor

24. Gisin,B.F. (1972), Anal.Chim.Acta 58, 248-249

25. Felix,A.M. u. Jimenez,M.H. (1973),
Anal.Biochem. 52, 377-381

26. Hörnle,S. u. Geising,W. (1971),
Z.Physiol.Chem. 352, 5-6

27. Hancock,W.S. Prescott,D.J., Vagelos,P.R.,Marshall,G.R. (1973), J.Org.Chem. 38, 774-781

28. Losse,A. (1971), Tetrahedron Lett. 52, 4989-4992

29. Sano,S., Tokunaga,R. u. Kun,K.A. (1971), Biochim.Biophys.Acta 244, 201-205

30. Bayer,E., Jung,G., Halasz,J. u. Sebestian,I. (1970), Tetrahedron Lett. 51, 4503-4505

31. Tregear,G.W., Niall,H.D., Potts,J.T.,Jr.,Leeman,S.E. u. Chang,M.M. (1971), Nature New Biol. 232, 87-89

32. Shemyakin,M.M., Ovchinnikow,Yu.A., Kiryushin,A.A. u. Kozhevnikova, I.V. (1965), Tetrahedron Lett. 27, 2323-2327

33. Bayer,E. u. Mutter,M. (1972), Nature 237, 512-513

34. Fridkin,M., Patchornik,K. u. Katchalski,E. (1966), J.Amer.Chem.Soc. 88, 3164-3165

35. Wieland,T. u. Birr,C. (1966), Angew.Chem. 78, 303

36. Fridkin,M., Patchornik,A. u. Katchalski, E. (1968), J.Amer.Chem.Soc. 90, 2953-2957

37. Gascoigne and Gascoigne, "Biological Degradation of Cellulose", Butterwortsh, London 1960

38. Mann, J. (1963), Meth. in Carbohydrate Chemistry Vol. III, 114-119

39. Malm,C.J., Tanghe,L.J. u. Laird,B.C. (1950), J.Amer.Chem.Soc. 72, 2674-2678

40. Malm,C.J., Tanghe,L.J., Laird,B.C. u. Smith,G.D. (1953), J.Amer.Chem.Soc. 75, 80-84

41. Cramer,F.B. u. Purves,C.B. (1939), J.Amer.Chem.Soc. 61, 3458-3462

42. Hiller,L.A. (1953), J.Polymer Sci. 10, 385

43. Malm,C.J. u. Tanghe L.J. (1955), Ind.Eng.Chem. 47, 995-999

44. Ranby,B.G. u. Rydholm,S.A. (1963), "Polymer Processes" (Calvin E. Schildknecht, ed.), Interscience Publ., N.Y., London, Sydney pp 351-428

45. Stannet, V. (1950), "Cellulose Acetate Plastics", Temple Press, London 1950

46. IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature Recommendations 1971 (1972), J.Biol.Chem. 247, 977-983

47. Wolfrom,M.L. u. Thompson,A. (1963), Meth. in Carbohydrate Chemistry Vol III, 143-150

48. Gattermann-Wieland, "Die Praxis des org. Chemikers", S.340-341, Walter De Gruyter & Co, 1962

49. Thybusch,D. et al. (1966), Acta Histochem. 23 (1-4), 127-130

50. Maurer, H.R., (Herausgeber), (1971), "Disc Electrophoresis and Related Techniques of Polyacrylamid Gel Electrophoresis, Walter De Gruyter & Co, Berlin-N.Y.

51. Moore,S. u. Stein,W.H. (1948), J.Biol.Chem.176, 367-388

52. Interlaboratory Study on Determination of Acetyl in Cellulose Acetate (1952), Anal.Chem. 24, 400-403

53. Fordyce,C.R., Genung,L.B. u. Pile,M.A. (1946), Ind.Eng.Chem., Anal.Ed. 18, 547

54. Kramer,P.J. (1973) Diplomarbeit Tübingen

55. Rinderknecht,H., Geokas,M.C.,Silverman,P. und Haverback,B.J. (1968), Clin.Chim.Acta 21, 197-203

56. Dekanski,J. (1954), Brit.J.Pharmacol. 9, 187

57. Stürmer,E. (1968), Handb. Exp. Pharm. XXIII, 130-189

58. Khairallah,P.A. u. Smeby,R.R. (1974), Handb. Exp. Pharm. XXXVII, 227-239

59. Gornall,B. et al.(1949), J.Biol.Chem. 177, 751-766

60. Lowry,O.H., Rosebrough,N.J., Farr,A.L. und Randall,R.J. (1951), J.Biol.Chem. 193, 265-275

61. Petterson,G. u. Porath,J. (1966), Meth. in Enzymology VIII, 603-607

62. Andrews,P. (1964), Biochem.J. 91, 222-223

63. Raacke, J.D. u. Li,C.H. (1955), J.Biol.Chem. 215, 277-285

64. Harzer,K. (1970), Z.Anal.Chem. 252, 170-174

65. Carpino,L.A., Giza,C.A. u. Carpino,B.A. (1959), J.Amer.Chem.Soc. 81, 955-957

66. Schnabel,E. (1967), Liebig's Ann.Chem. 702, 188-196

67. Rachmandrian,J. u. Li,C.H. (1962), J.Org.Chem. 27, 4006-4009

68. Boissonnas,R.A., Guttmann,S. et al (1958), Helv.Chim.Acta 41, 1867-1882

69. Benoiton,L. (1962), Can.J.Chem. 40, 570-572

70. Schnabel,E., Herzog,H., Hoffmann,P., Klauke,E. und Ugi,I. (1968), Liebigs Ann.Chem. 716, 175-185

71. Schröder,E. (1966), Liebigs Ann.Chem. 692, 241-245

72. Wünsch,E. u. Zwick,A. (1964), Chem.Ber. 97, 2497-2503

73. Chillemi,F. u. Merrifield,R.B. (1969), Biochemistry 8, 4344-4346

74. Wünsch,E. Fries,G. u. Zwick,A. (1958), Chem.Ber. 91, 542-547

75. Tanghe,L.J.,Genung,L.B. u. Mench,J.W. (1963), "Meth. in Carbohydrate Chemistry", Vol.III, 193-198

76. Tanghe,L.J.,Genung,L.B. u. Mench,J.W. (1963), "Meth. in Carbohydrate Chemistry", Vol.III, 198-201

77. Ghose,T.K. u. Kostick,J.A. (1969), Cellulases and their Applications" (E.Gould, ed.) pp 415-446, Amer.Chem.Soc.

78. Meienhofer,J. (1973), "Hormonal Proteins and Peptides",(Choh Hao Li,ed.) Vol.II, 45-267, pp. 163-164, Academic Press, N.Y. and London

79. Sakakibara,S. u. Shimonishi,Y. (;965), Bull.Chem.Soc.Jap. 38, 1412-1413

80. Organikum, VEB Deutscher Verlag der Wissenschaft, Berlin 1967

81. Ghose,T.K. (1969),Biotechnol. and Bioeng. Vol.XI,239-261

82. Cowling,E.B. u. Brown,W. (1969), "Cellulases and their Applications", (E.Gould,ed.), pp. 152-187, Amer. Chem. Soc.

83. Bodansky,M. u. Sheehan,J.T. (1964), Chem. Ind. (London), 1423-1424

84. Siu,R.G.H. (1951), "Microbial Decomposition of Cellulose", Reinhold, New York 1951

85. Whitaker,D.R. (1963),"Advances in Enzymic Hydrolysis of Cellulose and Related Materials",(E.T.Reese,ed.), pp. 51-70, Pergamon Press, Oxford

86. Selby,K. u. Maitland,C.C. (1967),Biochem.J. 104, 716-724

87. Jansen,E.F., Jang,R. u. Mc Donnell,L.R. (1947), Arch. Biochem. 15, 415-431

88. Ooms,A.J.J., Breebaart-Hansen,J.C.A. u. Ceulen,B.I. (1966), Biochem. Pharmecol. 15(1), 17-30

89. Jansen,E.F., Fellows-Nutting,M.D. u. Balls,A.K. (1947), J.Biol.Chem. 175, 975-987

91. Zoch,E. (1971), Arzneim.Forschung 21(2), 181-187

92. Oosterbaan,R.A. u. Cohen,J.A. (1964), Federation European Biochem.Soc.Symp. 1st, pp.87-95,London 1964

93. Lemming,M.R.G. (1973), U.S. 3.769.166 ; (1974) C.A. 80, 144 393 e

94. König,W. u. Geiger,R. (1970), B. 103, 788-798

95. Wünsch,E. u. Wendelberger,G. (1967), B. 100, 160-172

96. Deimer,K.H. ( 1974), Houben-Weyl-Müller Bd.15/1,334-336

LEBENSLAUF

Am 25.November 1944 wurde ich, Peter-Jürgen Kramer, als Sohn des Kaufmanns Helmut Kramer und seiner Ehefrau Gertrud geb. Brand in Eßlingen a.N. geboren. Vom Herbst 1951 bis Frühjahr 1956 besuchte ich die Volksschule in Stuttgart, anschließend das Friedrich-Eugens-Gymnasium in Stuttgart und die dortige Wirtschaftsoberschule, wo ich im Frühjahr 1966 die Reifeprüfung ablegte.

Im Sommersemester 1966 begann ich an der Universität Tübingen zunächst das Studium der Chemie, ab Herbst 1966 dann das Studium der Biochemie. Im September 1967 bestand ich den 1.Teil der Diplomvorprüfung, im Oktober 1969 den 2.Teil. Im Dezember 1973 legte ich die Diplom-Hauptprüfung für Biochemiker ab.

Von Februar 1974 bis Januar 1977 fertigte ich am Physiologisch-chemischen Institut der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.Dr. G. Weitzel die vorliegende Dissertation mit dem Thema: "Peptidsynthese an Celluloseacetat" an.

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Herren Professoren:

| | |
|---|---|
| Physiologische Chemie: | G. Weitzel, F. Schneider |
| Organische Chemie: | E. Müller, E. Bayer |
| Anorganische Chemie: | W. Rüdorff, W. Bues |
| Physikalische Chemie: | H. Mauser, G. Kortüm |
| Mikrobiologie: | H. Zähner |
| Mathematik: | W. Schweizer |
| Physik: | H. Krüger |
| Botanik: | E. Bünning, H. Metzner |
| Zoologie: | F.-P. Möhres, K.G. Grell |
| Anatomie: | K. Mörike |

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststrasse 58, 7 Stuttgart 1
Telefon (0711) 61 06 41

Druck: Polyfoto - Dr. Vogt KG
Forststrasse 58, 7 Stuttgart 1
Telefon (0711) 61 06 41